

# 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 4**

**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 ин-  
фекций» индексируется в РИНЦ  
и Scopus

Ответственность за достоверность ин-  
формации, 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. 4. 118 с.

Подписано в печать 25.12.19  
Формат 60×88 1/8  
Бумага мелованная  
Печать офсетная  
Усл. печ. л. 14,455  
Гарнитура Таймс. Заказ 38-20/130120

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)  
*Цэрэнноров Дамдиндорж*, 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 4

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)

*Tserennorov 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>

## Обзоры

- Гордеева М.В., Ляпин М.Н., Костюкова Т.А. Средства защиты органов дыхания при работе с возбудителями инфекционных болезней ..... 6
- Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Катунина Л.С., Василенко Е.И. Питательные среды для диагностики бруцеллеза ..... 17

## Оригинальные статьи

- Белякова Н.И., Ливанова Л.Ф., Громова О.В., Дуракова О.С., Клокова О.Д., Холматов К.И., Антонычева М.В., Девдариани З.Л., Волох О.А. Использование питательной среды на основе сухого гидролизата казеина в производстве холерной бивалентной химической вакцины ..... 26
- Буравцева Н.П., Мезенцев В.М., Рязанова А.Г., Головинская Т.М., Дегтярев Д.Ю., Пазенко А.Н., Семенова О.И., Куличенко А.Н. Использование геоинформационных систем для создания электронной базы данных сибиреязвенных захоронений на территории Ставропольского края ..... 31
- Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Катунина Л.С., Ростовцева Д.В., Костромин А.В. Мониторинг стабильности вакцины чумной живой, приготовленной с использованием питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного ..... 37
- Дугаржапова З.Ф., Чеснокова М.В., Иванова Т.А., Косилко С.А., Балахонov С.В. Совершенствование методических подходов к обследованию сибиреязвенных захоронений и скотомогильников ..... 41
- Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Альхова Ж.В., Куклева Л.М., Балькова А.Н., Гражданов А.К., Аязбаев Т.З., Майканов Н.С., Кутырев В.В. Распространение *Yersinia pestis* средневекового био-вара в Северном, Северо-Западном Прикаспии и Предкавказье во второй половине XX века ..... 48
- Казанцев А.В., Осина Н.А., Глинская Т.О., Кошелева О.Н., Максимов Ю.В., Девдариани З.Л., Микеров А.Н. Факторы вирулентности и филогенетическая характеристика уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных на территории г. Саратова ..... 56
- Куклева Л.М., Тучков И.В., Оглодин Е.Г., Девдариани З.Л., Морозов О.А., Кузнецов О.С., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А. Получение штамма *Yersinia pestis*, продуцирующего флуоресцентный белок GFP, и перспективы его использования ..... 61

## Reviews

- Gordeeva M.V., Lyapin M.N., Kostyukova T.A. Means of Respiratory Organs Protection for Work with Agents of Infectious Diseases
- Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. Nutrient Media for Diagnosis of Brucellosis

## Original articles

- Belyakova N.I., Livanova L.F., Gromova O.V., Durakova O.S., Klokova O.D., Kholmatov K.I., Antonycheva M.V., Devdariani Z.L., Volokh O.A. Usage of Nutrient Medium Based on Dry Hydrolysate of Casein in Manufacturing Bivalent Chemical Cholera Vaccine
- Buravtseva N.P., Mesentsev V.M., Ryazanova A.G., Golovinskaya T.M., Degtyarev D.Yu., Pazenko A.N., Semenova O.I., Kulichenko A.N. Use of Geographic Information Systems for Creation of Electronic Database of Anthrax Burial Sites in the Stavropol Territory
- Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Katunina L.S., Rostovtseva D.V., Kostrominov A.V. Monitoring of Stability of the Live Plague Vaccine Produced Using Condensed Corn Steep Extract Hydrolysate-Based Nutrient Medium
- Dugarzhapova Z.F., Chesnokova M.V., Ivanova T.A., Kosilko S.A., Balakhonov S.V. Improvement of Methodical Approaches to Investigation of Anthrax Burials and Animal Burial Sites
- Eroshenko G.A., Popov N.V., Al'khova Zh.V., Kukleva L.M., Balykova A.N., Grazhdanov A.K., Ayazbaev T.Z., Maikanov N.S., Kutyrev V.V. Dissemination of *Yersinia pestis* of Medieval Biovar in Northern, North-Western Caspian Sea Region and Fore-Caucasus in the Second Half of the Twentieth Century
- Kazantsev A.V., Osina N.A., Glinskaya T.O., Kosheleva O.N., Maksimov Yu.V., Devdariani Z.L., Mikerov A.N. Virulence Factors and Phylogenetic Characteristics of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated in Saratov
- Kukleva L.M., Tuchkov I.V., Oglodin E.G., Devdariani Z.L., Morozov O.A., Kuznetsov O.S., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A. Construction of *Yersinia pestis* Strain Producing Fluorescent Protein GFP and Prospects of Its Usage

**Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Наркевич А.Н., Архангельская И.В., Шубин Г.Г.** Конструирование диагностикума полимерного холерного антигенного на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы..... 67

**Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В., Ротов К.А., Негоденко А.О., Викторов Д.В.** Результаты испытаний дезинфицирующих средств в отношении возбудителей мелиоидоза и сапа..... 73

**Малецкая О.В., Таран Т.В., Прислегина Д.А., Платонов А.Е., Дубянский В.М., Волюнкина А.С., Василенко Н.Ф., Тохов Ю.Н., Цапко Н.В.** Природно-очаговые вирусные лихорадки на юге европейской части России. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом..... 79

**Портенко С.А., Абдрашитова А.С., Щербакowa Н.Е., Ерохин П.С., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарапова Н.А., Щербакowa С.А., Кутырев В.В.** Расширенное изучение штаммов легионелл, выделенных из объектов окружающей среды во время подготовки и проведения массовых мероприятий в Российской Федерации в 2013–2014 гг. .... 85

**Рудакова С.А., Теслова О.Е., Канешова Н.Е., Штрек С.В., Якименко В.В., Пенъевская Н.А.** Геновидовое разнообразие боррелий в иксодовых клещах на территории юга Западной Сибири..... 92

**Сутягин В.В., Ковалёва Г.Г.** Белки вакцинного штамма чумного микроба (*Yersinia pestis* EV НИИЭГ) с потенциальными свойствами аллергенов..... 97

**Яшина Л.Н., Сметанникова Н.А., Компанец Г.Г., Здановская Н.И., Иванов Л.И.** Молекулярная эпидемиология патогенных хантавирусов на Дальнем Востоке России, 2015–2018 гг. .... 102

**Краткие сообщения**

**Герасименко Е.В., Цапко Н.В., Гнусарева О.А., Шкарлет Г.П., Белова О.А.** Эпизоотологический мониторинг природного очага туляремии в Ставропольском крае за 2010–2017 гг. .... 109

**Дуракова О.С., Громова О.В., Гаева А.В., Генералов С.В., Ливанова Л.Ф., Клокова О.Д., Волох О.А.** Экспериментальное обоснование возможности использования перевиваемой линии клеток СНО-К1 для определения специфической активности компонентов холерной химической вакцины..... 113

**Юбилеи**

К 100-летию со дня рождения Михаила Николаевича Шилова ..... 117

**Памяти коллеги**

Памяти Косилко Сергея Александровича ..... 118

**Larionova L.V., Simakova D.I., Narkevich A.N., Arkhangel'skaya I.V., Shubin G.G.** Construction of Polymeric Antigenic Diagnosticum Based on *Vibrio cholerae* O1 Lipopolysaccharide ..... 67

**Luchinin D.N., Molchanova E.V., Rotov K.A., Negodenko A.O., Viktorov D.V.** Results of Tests of Disinfecting Materials in Regard to Melioidosis and Glanders Agents ..... 73

**Maletskaya O.V., Taran T.V., Prislegina D.A., Platonov A.E., Dubyansky V.M., Volynkina A.S., Vasilenko N.F., Tokhov Yu.N., Tsapko N.V.** Natural Focal Viral Fevers in the South of the European Part of Russia. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome ..... 79

**Portenko S.A., Abdrashitova A.S., Shcherbakova N.E., Erokhin P.S., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V.** Extensive Studies of Legionella Strains Isolated from the Environmental Objects during Preparation and Holding of Mass Events in the Russian Federation in 2013–2014 ..... 85

**Rudakova S.A., Teslova O.E., Kaneshova N.E., Shtrek S.V., Yakimenko V.V., Penyevskaya N.A.** Genospecies Diversity of Borrelia in Ixodes Ticks of the West Siberia ..... 92

**Sutyagin V.V., Kovaleva G.G.** Proteins of the plague microbe vaccine strain (*Yersinia pestis* EV NIIEG) with potential allergen properties ..... 97

**Yashina L.N., Smetannikova N.A., Kompanets G.G., Zdanovskaya N.I., Ivanov L.I.** Molecular Epidemiology of Pathogenic Hantaviruses in the Far East of Russia, 2015–2018 ..... 102

**Brief communications**

**Gerasimenko E.V., Tsapko N.V., Gnusareva O.A., Shkarlet G.P., Belova O.A.** Epizootologic Monitoring of Natural Focus of Tularemia in the Stavropol Region in 2010–2017 ..... 109

**Durakova O.S., Gromova O.V., Gaeva A.V., Generalov S.V., Livanova L.F., Klokhova O.D., Volokh O.A.** Experimental Substantiation of the Possibility to Use Finite Cell Line CHO-K1 for Determination of Specific Activity of Components of Chemical Cholera Vaccine ..... 113

**Anniversaries**

To the 100-th Anniversary of Mihail N. Shilov ..... 117

**Revering the Memory of the Colleague**

Of blessed memory of Sergey A. Kosilko ..... 118

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-6-16

УДК 616.9+614.8

М.В. Гордеева, М.Н. Ляпин, Т.А. Костюкова

## СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ ПРИ РАБОТЕ С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

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

Многообразие предлагаемых в настоящее время на рынке средств индивидуальной защиты органов дыхания (СИЗОД) вызывает необходимость анализа представленных образцов в отношении возможности их использования при работе с опасными биологическими агентами. В обзоре проведен анализ современных средств индивидуальной защиты органов дыхания. Изучены национальные и межгосударственные стандарты, национальные законодательные и нормативные документы, зарубежные рекомендации, материалы периодических изданий, касающиеся вопросов выбора и использования СИЗОД, а также информационные материалы об образцах СИЗОД, представленные производителями. Рассмотрены различные типы и модификации фильтрующих СИЗОД и предъявляемые к ним требования. Проанализированы особенности использования СИЗОД при работе с возбудителями инфекционных болезней. На основе проведенного исследования даны рекомендации по выбору и эксплуатации СИЗОД при работе с возбудителями инфекционных болезней, выявлены проблемы, требующие комплексного научно-технического и нормативного решения в целях обеспечения безопасности персонала, осуществляющего деятельность с возбудителями инфекционных болезней. Сделаны выводы о том, что для защиты сотрудников при работе с вредными и опасными биологическими агентами необходимо использовать СИЗОД с противоаэрозольной защитой. Выбор модификации для конкретных условий труда необходимо проводить на основе результатов оценки биологической опасности и анализа риска. Особенности выбора, эксплуатации, обеззараживания СИЗОД, мероприятия при аварии, связанной с нарушением целостности СИЗОД, должны быть утверждены документом учрежденческого уровня, согласно которому работник обязан проходить вводный и периодический инструктажи. Совершенствование нормирования в области биобезопасности должно направляться на внесение ясности в вопросе легитимности использования различных СИЗОД при работе с вредными и опасными биоагентами. Определены предпочтения в выборе СИЗОД при работе с ПБА.

*Ключевые слова:* средства индивидуальной защиты органов дыхания, патогенные биологические агенты, безопасность при работе с патогенными биологическими агентами.

*Корреспондирующий автор:* Гордеева Марина Вячеславовна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

*Для цитирования:* Гордеева М.В., Ляпин М.Н., Костюкова Т.А. Средства защиты органов дыхания при работе с возбудителями инфекционных болезней. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 4:6–16. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-6-16

**M.V. Gordeeva, M.N. Lyapin, T.A. Kostyukova**

### **Means of Respiratory Organs Protection for Work with Agents of Infectious Diseases**

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

**Abstract.** Diversity of currently available on the market means of respiratory organs protection (MROP) dictates the necessity to assess the specimens in regard to the possibility of using them for work with dangerous biological agents. The review presents the analysis of modern personal protection equipment for respiratory organs. National and inter-state standards, national legislative and normative documents, foreign recommendations, materials from periodicals, related to the matters of selection and usage of MROP, as well as information on the MROP models provided by manufacturers have been studied. Considered are different types and modifications of filtering MROP and applicable to them requirements. Peculiarities of MROP usage when working with agents of infectious diseases are also analyzed. Based on the conducted research, recommendations on the selection and exploitation of MROP for work with infectious diseases agents have been put forward, problematic aspects that require complex scientific-technical and regulatory solutions in order to ensure the safety of the personnel involved in handling infectious disease agents have been identified. The following conclusions are drawn: to protect the staff performing operations with harmful and dangerous biological agents, it is necessary to use MROP with anti-aerosol barriers; the choice of modification for specific situations and working conditions should be based on the results of assessment of biological hazard and associated risks. Peculiarities of the options, exploitation, and decontamination of MROP, actions in case of an accident related to the breaching of MROP integrity must be covered in the regulatory document at the institutional level, according to which an officer is obliged to receive introductory and recurring instructions. Enhancement of regulatory procedures in the sphere of biological safety provision should aim at clarification of legitimacy of using specific MROP for work with harmful and dangerous biological agents. Preferences in the choice of MROP for work with PBA have been pointed out.

*Key words:* means of respiratory organs protection, pathogenic biological agents, safety of works with pathogenic biological agents.

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

*Corresponding author:* Marina V. Gordeeva, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

*Citation:* Gordeeva M.V., Lyapin M.N., Kostyukova T.A. Means of Respiratory Organs Protection for Work with Agents of Infectious Diseases. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:6–16. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-6-16

*Received 06.02.18. Accepted 13.05.19.*

Как показано многими исследованиями, загрязнение воздуха микроорганизмами, являющимися возбудителями инфекционных болезней и представляющими биологическую опасность для персонала, в той или иной степени происходит при диагностических и экспериментальных лабораторных операциях, производственных процессах с использованием патогенных биологических агентов (ПБА), в процессе ухода и лечения инфекционных больных, а также при возникновении аварийных ситуаций (аварии с разбрызгиванием) [1–3]. Согласно требованиям обеспечения биологической безопасности и охраны труда, для создания условий приемлемого риска необходимо применение эффективных в отношении биологически опасных агентов СИЗОД, а также правильная эксплуатация и обучение персонала.

В настоящее время производители представляют на рынок широкий спектр средств защиты органов дыхания. В условиях наличия широкого ассортимента СИЗОД проведение анализа эффективности представленных образцов респираторных средств защиты и их эксплуатации с учетом особенностей как самих биологически опасных агентов, так деятельности с их использованием, обретает особую важность. С целью анализа эффективности и особенностей эксплуатации различных типов и модификаций СИЗОД при работе с возбудителями инфекционных болезней изучены и проанализированы информационные материалы об образцах СИЗОД, представленные производителями, а также национальные и межгосударственные стандарты, иные нормативные документы, зарубежные рекомендации, материалы периодических изданий, касающиеся вопросов выбора и использования СИЗОД.

Действующее законодательство Российской Федерации (РФ) содержит ряд требований к работодателю, направленных на предупреждение профзаболеваний и несчастных случаев у работающих во вредных и опасных условиях. Обязанность обеспечения персонала средствами защиты в соответствии с типовыми нормами установлена в Трудовом кодексе РФ (в редакции № 90-ФЗ от 30.06.2006 г.) и в Межотраслевых правилах обеспечения работников специальной одеждой, специальной обувью и другими средствами индивидуальной защиты, утвержденных приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 01.06.2009 г. № 290н.

В «Типовых отраслевых нормах бесплатной выдачи специальной одежды, специальной обуви и других средств индивидуальной защиты работникам организаций здравоохранения и социальной защиты населения, медицинских научно-исследовательских организаций и учебных заведений, производств бактерийных и биологических препаратов, мате-

риалов, учебных наглядных пособий, по заготовке, выращиванию и обработке медицинских пиявок», утвержденным постановлением Министерства труда и социального развития РФ от 29.12.1997 г. № 68, в качестве СИЗОД предлагается использовать марлевые респираторы и марлевые повязки. Исследования последних десятилетий показывают, что марлевые респираторы и повязки практически не защищают персонал от проникновения биологически опасных агентов в органы дыхания [1, 2]. Кроме того, предлагаемые в указанных Типовых нормах средства защиты органов дыхания не отнесены ни к одной группе, согласно современной классификации СИЗОД.

Согласно Межгосударственному стандарту системы стандартов безопасности труда (ССБТ) «Средства индивидуальной защиты органов дыхания. Классификация и маркировка» ГОСТ 12.4.034-2001 (ЕН 133-90), СИЗОД подразделяются на изолирующие и фильтрующие.

Изолирующие СИЗОД обеспечивают подачу чистого воздуха или дыхательной смеси на основе кислорода от какого-либо источника.

Фильтрующие – обеспечивают очистку (фильтрацию) воздуха рабочей среды, поступающего для дыхания, снижают концентрацию опасных и вредных агентов во вдыхаемом воздухе до приемлемой.

В приложении к приказу Министерства труда и социальной защиты РФ от 09.12.2014 г. № 997н «Типовые нормы бесплатной выдачи специальной одежды, специальной обуви и других средств индивидуальной защиты работникам сквозных профессий и должностей всех видов экономической деятельности, занятым на работах с вредными и (или) опасными условиями труда, а также на работах, выполняемых в особых температурных условиях или связанных с загрязнением» среди всех перечисленных профессий и должностей, деятельность которых может быть связана с биологической опасностью, указаны дезинфектор, лаборант-микробиолог, лаборант химико-бактериологического анализа, начальник лаборатории, старший лаборант, которым установлены нормы выдачи средства индивидуальной защиты органов дыхания фильтрующего или изолирующего (до износа). Но типовые нормы не предоставляют критерии выбора того или иного типа СИЗОД с учетом степени опасности биоагента и работ, с ним выполняемых, не учитывают защитные свойства СИЗОД.

Существуют общие критерии выбора фильтрующего или изолирующего механизма защиты [4–7].

Изолирующие СИЗОД применяют в случаях недостаточного содержания кислорода (объемная доля менее 17 %), а также в случаях, когда в атмосфере присутствуют опасные вещества, которые могут по-

влекать мгновенное негативное воздействие на организм человека, вредные или опасные вещества неизвестного состава и концентраций, при объемной доле вредных веществ в воздухе более 0,5 %, а также когда не обеспечивается защита фильтрующими СИЗОД.

Фильтрующие – применяются при содержании кислорода в окружающей среде не менее 17 %, а также при известном качестве и количестве (концентрация до 0,5 %) опасных и вредных веществ.

Таким образом, изолирующие средства защиты органов дыхания следует применять при работах с ПБА, представляющими максимальную опасность: в максимально изолированных лабораториях с возбудителями особо опасных инфекционных болезней, при применении возбудителей особо опасных инфекционных болезней либо неизвестных патогенов в качестве агентов биотерроризма или в качестве биооружия, в комплексе с изолирующими защитными костюмами. Это закреплено в национальных санитарно-эпидемиологических правилах (СП) по безопасности работ с ПБА I–II групп СП 1.3.3118-13, Регламенте (стандарте) функционирования специализированных противоэпидемических бригад при ликвидации медико-санитарных последствий чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера, утвержденном приказом Роспотребнадзора от 22.11.2007 г. № 330, в международных рекомендациях по обеспечению биобезопасности [8].

Использование фильтрующих СИЗОД регламентировано СП 1.3.3118–13 в составе ПЧК I типа (противопылевые респираторы с фильтрующими элементами класса защиты не ниже FFP3, полная маска или фильтрующий противогаз с противоаэрозольной или комбинированной коробкой, а также пневмокостюмы, пневмокуртки и пневмошлемы).

Согласно аксиоме о том, что максимальная опасность возникает реже [9], фильтрующие СИЗОД применяются чаще. Поэтому настоящий обзор будет посвящен фильтрующим СИЗОД.

Согласно ГОСТ 12.4.034-2001 (ЕН 133-90) и ГОСТ 12.4.034-2017 «ССБТ. Средства индивидуальной защиты органов дыхания. Классификация и маркировка», фильтрующие СИЗОД подразделяются на противогазовые, противоаэрозольные и противогазоаэрозольные (комбинированные). Механизм защитного действия противогазовых СИЗОД основан на поглощении паров и газов опасного вещества. Выбор противогазовых СИЗОД при работе с ПБА не целесообразен, так как микроорганизмы находятся во вдыхаемом воздухе в состоянии аэрозоля твердых частиц [1, 3, 10]. Для защиты от проникновения в органы дыхания человека взвешенных в воздухе рабочей зоны частиц используются задерживающие их фильтры. Высокоэффективные фильтрующие материалы – это равномерные слои электростатически заряженных очень тонких полимерных волокон, которые нанесены на подложку из марли или нетканого материала. Подобные элементы входят в состав противоаэрозольных СИЗОД [11, 12]. Для обозначения

СИЗОД с противоаэрозольной защитой в литературе используется также термин «противопылевой».

Использование комбинированных СИЗОД при работе с ПБА оправдано тем, что они содержат в себе противогазовый (поглощающий) и противоаэрозольный элементы.

В соответствии с ГОСТ 12.4.034-2017 «Система стандартов безопасности труда. Средства индивидуальной защиты органов дыхания. Классификация и маркировка», фильтрующие СИЗОД разделяют на средства защиты без принудительной подачи (за счет дыхательных движений самого человека) и с принудительной подачей воздуха. По определению ГОСТ 12.4.234-2012 (ЕН 12941:1998) «ССБТ. Средства индивидуальной защиты органов дыхания. Фильтрующие СИЗОД с принудительной подачей воздуха, используемые со шлемом или капюшоном. Общие технические требования. Методы испытаний. Маркировка (с Поправкой)» фильтрующее СИЗОД с принудительной подачей воздуха (power filtering device – силовое фильтрующее устройство) – это СИЗОД, в котором воздух поступает в фильтр (фильтры) и подается в органы дыхания посредством воздуходувки.

Согласно ГОСТ 12.4.034-2001 (ЕН 133-90), конструктивно фильтрующие СИЗОД без принудительной подачи воздуха подразделяются на фильтрующие лицевые части и лицевые части из изолирующих материалов с присоединяющимся к ним фильтром (фильтрами).

СИЗОД с фильтрующей лицевой частью – это респираторы, называемые также фильтрующими полумасками, которые состоят из фильтрующего материала, формирующего лицевую часть, фильтрующая составляющая которой является неотъемлемой частью СИЗОД, и системы крепления в виде тесемок или резинок с регуляторами посадки респиратора по охвату головы. Фильтрующие полумаски закрывают нос, рот и подбородок. Размер фильтрующих полумасок в основном универсальный. Однако обзор рынка фильтрующих полумасок показал, что существуют респираторы, которые в длину могут достигать 225–250 мм (например, респираторы серии АЛИНА, Россия), также существуют респираторы маленького размера (например, 3M VFlex™ 9153RS, США) [13–17].

Фильтрующие полумаски могут быть бесклапанные и с клапаном (клапанами) вдоха и/или выдоха, формованные и неформованные. Формованные полумаски имеют твердую форму. Неформованные полумаски выполнены из мягкого материала, имеют форму круга (овала), могут быть с распорками и без [18, 19].

Наиболее давно и широко известным представителем бесклапанных неформованных фильтрующих полумасок является ШБ 1 «Лепесток» [20]. Среди неформованных с клапаном выдоха известны респираторы АЛИНА-316 (Россия) [13]. По форме респираторы бывают чашеобразными (например 3M™8132, США) [16], чашеобразными с фигурной носовой ча-

стью (например SPIROTEK VS 2300V, США) [21], складными по горизонтали и по вертикали, двух- или трехпанельными (например 3M™ Aura™ 9332+, 3M™ VFlex™ 9153RS\*, США; SPIROTEK SH3300V, SPIROTEK VS 4300V, США) [16, 21].

Фильтрующие СИЗОД без принудительной подачи воздуха, выполненные в виде лицевой части и присоединяющегося к ней фильтра (фильтров), представлены в виде четвертьмаски, полумаски, полнолицевой маски, снабженной противоаэрозольным или комбинированным фильтром (фильтрующей системой). По ГОСТ Р 12.4.190-99 «ССБТ. Средства индивидуальной защиты органов дыхания. Полумаски и четвертьмаски из изолирующих материалов. Общие технические условия», четвертьмаска – это лицевая часть СИЗОД, закрывающая нос и рот; полумаска – это лицевая часть СИЗОД, закрывающая нос, рот и подбородок; маска – это лицевая часть СИЗОД, закрывающая лицо. Изолирующая лицевая часть четвертьмасок, полумасок и полнолицевых масок плотно прилегает к лицу, может быть выполнена из резины, силикона или пластика.

Лицевая часть фильтрующих СИЗОД с принудительной подачей воздуха может быть выполнена (согласно ГОСТ 12.4.034-2017) в виде капюшона, шлема, шлем-маски, которые выполняются из специальных тканей, малопроницаемых или непроницаемых для частиц, с герметично установленным панорамным экраном, интегрированным или неинтегрированным фиксирующим оголовьем. Их используют с системами принудительной подачи воздуха централизованного или автономного типа. Подобные системы подают воздух, очищенный с помощью фильтров. При автономном использовании, фильтры, в количестве одного или двух, присоединяются резьбовым соединением к вентиляционной установке либо интегрированы в нее. Из-за повышенного давления под лицевой частью не происходит просачивания неотфильтрованного воздуха рабочей среды через зазоры между лицевой частью респиратора и лицом.

Фильтрующая система может быть представлена одним или парой съемных фильтров, заключенных в металлическую коробку или пластиковый держатель. Фильтры присоединяются к изолирующей лицевой части при помощи байонетного или стандартного резьбового крепления. Фильтрующая система также может дополняться префильтром. При загрязнении фильтра уловленной пылью его свойства изменяются. В случае работы с микроорганизмами использование префильтра оправданно при сильном пылевом загрязнении воздуха, чтобы основной фильтр «не забивался» и время его защитного действия не уменьшалось относительно заявленных паспортных параметров.

Следует различать полумаски фильтрующие и изолирующие с фильтром (фильтрующим элементом).

В России и Европе противоаэрозольные (противопылевые) фильтры маркируют символом «Р»

(англ. particles – частицы) и цифрой, означающей класс эффективности. В свою очередь респираторы, изготовленные из фильтрующего материала, маркируют символами «FFP» (англ. Filtering facepiece particulate – фильтрующая лицевая часть от частиц) и цифрой, означающей класс эффективности (FFP-респираторы).

Согласно классификации, приведенной в ГОСТ 12.4.294-2015 (EN 149:2001+A1:2009) «Система стандартов безопасности труда. Средства индивидуальной защиты органов дыхания. Полумаски фильтрующие для защиты от аэрозолей. Общие технические условия», фильтрующие полумаски для защиты от аэрозолей подразделяют на три класса в зависимости от их фильтрующей эффективности и обозначают: FFP1 – низкая эффективность; FFP2 – средняя эффективность; FFP3 – высокая эффективность.

Фильтры в зависимости от их фильтрующей эффективности в соответствии с классификацией, приведенной в ГОСТ 12.4.246-2016 (EN 143:2000) «ССБТ. Средства индивидуальной защиты органов дыхания. Фильтры противоаэрозольные. Общие технические условия», подразделяют тоже на три класса: P1 – фильтры низкой эффективности; P2 – средней эффективности; P3 – фильтры высокой эффективности.

Фильтрующие полумаски 3 класса обеспечивают 99 % очистки воздуха, высокоэффективные фильтры 3 класса – 99,95 %; фильтрующие полумаски 2 класса и фильтры средней эффективности 2 класса – 94 %; фильтрующие полумаски 1 класса и фильтры низкой эффективности 1 класса – 80 % [12].

Фильтрующие полумаски маркируются фиксирующими ремнями разного цвета в зависимости от класса защиты. Сменные противоаэрозольные фильтры имеют маркировку белого цвета.

В настоящее время в Европейском Союзе и в РФ принята похожая классификация противоаэрозольных фильтров. А в США классификация противоаэрозольных фильтров, а также фильтрующих полумасок отличается от европейской [7, 12, 22]. В соответствии с классификацией Национального института охраны труда США, различают противоаэрозольные фильтры (фильтрующие полумаски):

- для улавливания не содержащего масла аэрозоля: высокоэффективные – N100 (99,97 %), средней эффективности – N99 (99 %), низкой эффективности – N95 (95 %);

- для улавливания содержащего масла аэрозоля: высокоэффективные – R100 (99,97 %), средней эффективности – R99 (99 %), низкой – R95 (95 %);

- для улавливания любого аэрозоля: высокоэффективные – P100 (99,97 %), средней эффективности – P99 (99 %), низкой – P95 (95 %).

Имеется также цветовая маркировка в зависимости от класса. Национальный институт охраны труда США для защиты персонала при контакте с возбудителями острых респираторных вирусных инфекций, включая ТОРС, рекомендует использование

респиратора N95.

Существующая классификация фильтрующих СИЗОД по эффективности основана на значениях предельно допустимой концентрации (ПДК) опасного вещества в рабочей зоне и после очистки на фильтре в области органов дыхания. Подобный подход оправдан при выборе СИЗОД в отношении защиты от опасных химических и радиоактивных веществ, содержанию которых в воздухе можно дать точную количественную оценку. Как известно, особенность биологической опасности состоит в том, что биологические агенты способны к бесконтрольному самовоспроизведению и размножению. Перечисленные особенности не дают возможности применить значения ПДК микроорганизмов для создания собственной классификации, к тому же инфицирующие и летальные дозы микроорганизмов даже внутри вида могут иметь широкий диапазон. Кроме того, при определении классов условий труда и выборе СИЗОД для защиты от биологического вредного фактора (микробы и вирусы), в соответствии с Руководством Р 2.2.2006-05 «Гигиена труда. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда», следует учитывать не только превышение ПДК в воздухе рабочей зоны, но и, в первую очередь, группу патогенности (опасности) микроорганизмов.

ГОСТ 12.4.294-2015 устанавливает для фильтрующей полумаски класса FFP3 проницаемость фильтра 1%, коэффициент проникания через СИЗОД – 2%, коэффициент защиты – 50 ПДК. Следовательно, можно сделать вывод, что использование FFP-респираторов высокой эффективности (класс 3) при работе с ПБА высокой степени опасности определено необходимостью самой высокой защиты, обусловленной особенностью биологических агентов и их опасностью. Так, выбор респираторов класса FFP3 нормативно установлен санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работ с ПБА I–II групп СП 1.3.3118-13, но в санитарно-эпидемиологических правилах СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» класс эффективности FFP-респираторов не установлен. Есть рекомендации, что для работ с микроорганизмами низкой и средней степени опасности (по классификации ВОЗ, 2004) возможно использование класса защиты 2, за исключением работ с возбудителем туберкулеза [18, 22]. Однако нормативного закрепления необходимости использования FFP2-респираторов при работе с ПБА III–IV групп в РФ нет.

Исходя из защитных характеристик съёмных противоаэрозольных фильтров, при работе с возбудителями инфекционных агентов также следует выбирать высокоэффективные фильтры (класс P3).

Возможность однократного или многократного использования фильтрующих полумасок определяется ГОСТ 12.4.294-2015 (EN 149:2001+A 1:2009), а противоаэрозольных фильтров – ГОСТ 12.4.246-

2016 (EN 143:2000).

Согласно требованиям данных стандартов, фильтрующие полумаски для защиты от аэрозолей и противоаэрозольные фильтры могут быть одноразовыми, предназначенными для использования в течение не более одной смены – маркируются буквами NR (non re-useable), и многоразовыми, предназначенными для использования в течение более одной смены – маркируются буквой R (re-useable). Согласно ГОСТ 12.4.294-2015, если фильтрующая полумаска предназначена для многоразового использования, то материал, из которого она изготовлена, должен быть устойчивым к использованию чистящих или дезинфицирующих средств, рекомендуемых изготовителем. После чистки и дезинфекции, в соответствии с инструкциями по эксплуатации, составленными изготовителем, многоразовая фильтрующая полумаска должна соответствовать требованиям ГОСТ по проницаемости фильтрующего материала двумя тест-аэрозолями: хлорид натрия и парафиновое масло. Испытания проводят в соответствии с ГОСТом.

Использование многоразовых фильтрующих полумасок и многоразовых фильтров привлекательно с экономических позиций. Однако сопряжено с рядом трудностей. Во-первых, использование респиратора/противоаэрозольного фильтра в качестве защиты органов дыхания при работе с ПБА требует его дальнейшего обеззараживания. Согласно действующим СП 1.3.3118–13 по безопасности работ с ПБА, обеззараживание возможно химическим способом (замачивание в дезрастворе, обработка парами формалина) или физическим – высокотемпературным воздействием. Это в полной мере соблюдается при одноразовом использовании, когда после обеззараживания респиратор или фильтры рассматриваются как отходы и утилизируются. Респираторы или фильтры, предназначенные для многоразового использования, должны проходить обеззараживание перед дальнейшим использованием в соответствии с требованиями национальных нормативов по безопасности работ с ПБА, а также в соответствии с рекомендациями, представленными в инструкции производителя, которые не всегда отражают особенности работы с ПБА, либо содержат режимы и методы, не утвержденные российскими санитарными правилами. Кроме того, природа фильтрующего материала может оказаться неустойчивой к высокотемпературным воздействиям и повышенной влажности (намоканию), например, фильтры Петрянова [1, 23]. Сведения об этом должны содержаться в маркировке изделия и в маркировке на упаковке, а в указаниях по эксплуатации должны быть указаны ограничения по применению изделия (в условиях повышенных и пониженных температур и повышенной влажности). При намокании большинство фильтрующих материалов теряют электростатический заряд, что делает их неэффективными. В СП 1.3.3118-13 для обеззараживания коробок фильтрующих СИЗОД предлагается использование паров формальдегида, что в свою очередь также требует наличия специальных

помещений, камер и обученного персонала для проведения обеззараживания подобным методом. После проведения обеззараживания необходима проверка проницаемости фильтрующего материала полумаски и отдельных фильтров, что требует наличия специального аттестованного оборудования и персонала. Следовательно, при условиях работ, требующих постоянного, практически каждодневного применения (например НИИ, где происходит экспериментальная, диагностическая и производственная деятельность с использованием особо опасных биологических агентов), вопрос использования многоразовых фильтрующих полумасок и съемных фильтров актуален для рассмотрения. При осуществлении деятельности, требующей не частого употребления СИЗОД, целесообразно применять их однократно и утилизировать с проведением предварительного обеззараживания. Также встает вопрос об обеззараживании лицевых частей, шлангов и фильтровентиляционных установок после проведения работ в «заразной» зоне. При отсутствии рекомендаций производителя необходима разработка программы обеззараживания в соответствии с учетом требований национальных нормативов и физико-химических свойств материалов, из которых выполнены элементы СИЗОД (устойчивость к высоким температурам, действию дезсредств, отсутствие влияния на эффективность применяемых дезсредств).

Требование устойчивости к запылению для одноразовых фильтрующих полумасок не является обязательным, а для многоразовых – является. Многоразовые фильтрующие полумаски должны быть испытаны на запыление в соответствии с требованиями ГОСТ, а после прохождения испытаний маркированы буквой D, которая указывается после класса эффективности и варианта использования.

СИЗОД со сменными фильтрами являются более долговечными, так как использованные фильтры всегда можно заменить на новые. Однако при анализе ценового вопроса можно заметить, что сменный противоаэрозольный фильтр часто стоит не меньше, чем фильтрующая полумаска аналогичной степени защиты.

По характеру вентилирования подмасочного пространства фильтрующие СИЗОД разделяют на бесклапанные, с так называемым маятниковым типом дыхания, где вдыхаемый и выдыхаемый воздух проходит через фильтрующий элемент, и клапанные, в которых вдыхаемый и выдыхаемый воздух движется различными путями за счет системы клапанов вдоха и выдоха. Клапанные респираторы отличаются друг от друга числом и расположением клапанов на полумаске. СИЗОД, оснащенные клапаном выдоха, обладают наименьшим сопротивлением дыханию, в сравнении с бесклапанными, что делает их более комфортными в эксплуатации. Кроме того, наличие клапана выдоха обеспечивает отведение излишней влаги из подмасочного пространства и, следовательно, меньшее увлажнение фильтрующего материала, что способствует удержанию высоких за-

щитных свойств. При проведении работ при температуре воздуха выше +28 °С или ниже 0 °С, а также при высоком уровне физической нагрузки, предпочтение следует отдавать респираторам с клапанами выдоха. Кроме того, в течение смены должны быть установлены дополнительные перерывы, помимо предусмотренных существующей организацией труда, с заменой СИЗОД при возвращении к работе [24]. Кроме клапанной системы, способствующей устранению конденсата из подмасочного пространства, респираторы могут быть оснащены специальными влагопоглощающими вкладышами, что в условиях повышенной или пониженной температуры более предпочтительно.

Кроме проницаемости фильтра, еще одним важным фактором, влияющим на защитную эффективность фильтрующей полумаски и СИЗОД с изолирующей лицевой частью с фильтрующей системой, является герметичность прилегания к поверхности кожи. От плотности прилегания зависит величина подсоса загрязненного воздуха в подмасочное пространство. Экспериментальные измерения показали, что реальный коэффициент защиты фильтровального материала 109–132, а эффективность всего СИЗОД от 2 до 8, то есть значительно меньше из-за подсосов неотфильтрованного воздуха через зазоры между маской и лицом. Показано, что зазоры между респиратором и лицом относительной площадью ~0,1 % приводят к уменьшению коэффициента защиты в 3,5 раза для высокодисперсных и почти в 48 раз для частиц с размерами выше 100 нм. [20, 25, 26]. Уровень защиты в большинстве случаев определяется конструкцией самой маски. Согласно литературным данным, использование СИЗОД со съемными фильтрами обеспечивает защиту до 50 ПДК – для полумаски с фильтрами P3 и до 200 ПДК – для полнолицевой маски с фильтрами P3 (в сравнении с FFP3-респиратором – до 30 ПДК) [27]. Кроме того, важным является обучение персонала, профессионализм и ответственность пользователя и работодателя. Все показатели эффективности действительны, только тогда, когда маска индивидуально подбирается к лицу, плотно прилегает к коже, а плотность прилегания проверяется специальными методами. В противном случае СИЗОД надежным быть не может, так как нефильтрованный воздух просачивается через зазоры между маской и лицом.

Формованные фильтрующие полумаски твердые, имеют форму, которая часто довольно точно повторяет форму лица (нос, скулы, подбородок), плотно прилегают к лицу за счет ремней оголовья и металлического зажима в области носа.

Неформованные полумаски мягкие, имеют форму круга (овала), легко подстраиваются под форму лица, при надевании требуют тщательного и равномерного разглаживания. Прилегание к лицу обеспечивается за счет эластичного обтюлятора (резинки), металлического зажима в области носа и ремней оголовья.

Некоторые фильтрующие полумаски снабжают-

ся мягким уплотнителем. Для более плотного прилегания важно, чтобы оголовье было с двумя лентами (ремнями), обеспечивающими крепление на затылке и на темени, и с регуляторами длины.

В формованных и неформованных фильтрующих полумасках есть свои плюсы и минусы. Положительные стороны использования формованных полумасок: анатомическая форма способствует тому, что нос не упирается в полумаску (в отличие от неформованных); материал, из которого сделан уплотнитель (обтюратор) в формованных полумасках – это не фильтрующий материал, а вспененный полимер, то есть получается так называемый изолирующий контур. Отрицательные: твердый респиратор, который удерживается на лице с помощью давления лент оголовья, неизбежно будет смещаться на лице при движении и разговоре, образуя зазоры. В мягких конструкциях («Лепесток», «АЛИНА») обтюратор фильтрующий. Его эластичность позволяет избежать смещений при поворотах и наклонах головы, движениях мимической мускулатуры и разговорной речи.

Для фильтрующих СИЗОД с изолирующей лицевой частью, согласно ГОСТ 12.4.296-2015 «ССБТ. Средства индивидуальной защиты органов дыхания. Респираторы фильтрующие. Общие технические условия», установлен коэффициент подсоса по аэрозолю хлорида натрия или коэффициент подсоса по аэрозолю масляного тумана под полумаску респиратора с комбинированным или противоаэрозольным фильтром, который должен быть не более 2 %.

СИЗОД с изолирующей лицевой частью и фильтрами выпускаются универсального (стандартного) размера и нескольких размеров (чаще двух или трех). Форма и размер универсальных СИЗОД такие, что хорошее прилегание может быть обеспечено только для типичных типов/размеров лиц. Учитывая огромное разнообразие лиц, определяемое индивидуальными, гендерными, этническими различиями, универсальный размер не всегда обеспечивает герметичное прилегание, и необходимо подобрать СИЗОД соответствующего размера и формы. Например, полнолицевая маска 3М серии 6000 или 7000 (3М, США), SPIROTEK FM 7000 (США) имеет три размера: маленький (S), средний (M) и большой (M/L), шлем-маски МГП (Россия) 1, 2, 3 рост, а МАГ-2, МАГ-3 (Россия) – один универсальный размер [16, 28–31].

Способы и методы проверки плотности прилегания СИЗОД (отсутствия подсоса загрязненного воздуха) должны быть указаны в инструкции по эксплуатации. Существуют качественные и количественные методы проверки. Качественно оценивается создание избыточного давления на выдохе, сопротивление вдоху, ощущение раздражения слизистых или вкусовые ощущения при подсосе тестового вещества в подмасочное пространство.

Проверку плотности прилегания респиратора (фильтрующей полумаски) к лицу осуществляют следующим образом: необходимо аккуратно нало-

жить обе руки на переднюю часть респиратора так, чтобы не сдвинуть его с места, а затем сделать короткий выдох. При этом под респиратором вы должны ощутить избыточное давление. В случае обнаружения какого-либо подсоса воздуха, подрегулируйте положение респиратора и/или натяжение тесемок. После этого снова проверьте прилегание. Повторять эту процедуру необходимо до достижения плотного прилегания респиратора.

При необходимости проверки герметичности лицевой части фильтрующего СИЗОД необходимо надеть маску, закрыть отверстие присоединения фильтра резиновой пробкой (рукой) и сделать глубокий вдох. Если воздух под лицевую часть не проходит – прилегание плотное.

Проверку качества подбора лицевой части также можно осуществить пробой с хлорпикрином. Ее проводят в палатке (помещении) с парами хлорпикрина. При правильно собранном и надетом СИЗОД не должно ощущаться раздражения глаз и верхних дыхательных путей [32]. Проба с распылением насыщенного раствора глюкозы на определенном расстоянии от сотрудника в СИЗОД более проста в исполнении. При плотном прилегании лицевой части пользователь не ощущает сладкий вкус [6, 7].

Существуют также инструментальные способы проверки. Они не зависят от субъективных ощущений (вкусовых, обонятельных) отдельного сотрудника. Известна методика обнаружения локализации подсоса воздуха в подмасочное пространство средств индивидуальной защиты органов дыхания с помощью люминесцирующих аэрозолей [33–35]. В России данный метод утвержден Главным государственным санитарным врачом в виде методических указаний от 03.03.2004 г. МУ 2.2.8. 894-04.

Простые качественные методы проверки необходимо применять перед входом в рабочую зону. Хорошей практикой является наличие системного повторного выполнения проверок. Также рекомендовано проведение проверок после значительного изменения массы тела, объемных стоматологических вмешательств, при появлении изменений кожи лица (рубцы, родимые пятна). При применении респиратора людьми с бородой, щетиной, бакенбардами, препятствующими плотному прилеганию полумаски, эффективность респиратора снижается вследствие неплотного прилегания по полосе обтюрации. Существуют и медицинские противопоказания препятствующие герметизации или креплению СИЗОД (деформация и хронические заболевания костей черепа, хронические заболевания кожи, опухоли лица и головы) [6, 7, 24, 36].

Количественные методы требуют специализированного оборудования и более сложны в исполнении, основаны на сравнении концентраций вредных веществ в окружающей среде и в подмасочном пространстве. Тестирование проводится в соответствии с утвержденными методами.

Проведение подобных проверок позволяет подобрать конструкцию и размер СИЗОД в соответствии

с индивидуальными особенностями человека, оценить правильность надевания конкретным пользователем; провести сравнительную оценку защитных свойств СИЗОД (в том числе на наиболее уязвимом участке – линии обтюрации фильтрующих респираторов); наглядно обучить сотрудников правильному применению СИЗОД. При выдаче СИЗОД для применения в процессе труда или для использования в качестве дежурного средства необходимо обеспечить индивидуальную предварительную примерку и подгонку, проверку его годности и комплектности. Работодатель должен помнить об ответственности за здоровье и жизнь работника при обеспечении не эффективными при работах определенной степени опасности, с неподтвержденной эффективностью, некачественными СИЗ, а также за обучение пользованию СИЗ, в том числе и СИЗОД. Если работник имеет нестандартные размеры, то это необходимо учитывать при обеспечении СИЗ, и закупать, пусть даже индивидуально, соответствующий размер. В данном вопросе финансовое бремя не должно перевешивать. Работник также должен понимать свою меру ответственности и обязательно проходить инструктаж по пользованию СИЗОД и соблюдать технику безопасности, некоторые пункты которой, на первый взгляд касающиеся абсолютно частных вопросов (например ношение бороды и усов), могут вызвать неприятие. Не стоит забывать о том, что недостатки в материально-техническом обеспечении и другие мотивы не могут служить основанием для отступления от требований безопасности (п. 2.1.17 СП 1.3.3118-13).

Использование шлемов, капюшонов с устройствами принудительной подачи воздуха предпочтительно в плане отсутствия зависимости от индивидуальных особенностей лица, ношения бороды. Свободная конструкция также позволяет использовать корригирующие очки (в отличие, например, от многих полнолицевых масок). Защитное средство легко надевается. Отсутствует сопротивление вдоху и выдоху. Постоянный приток воздуха обеспечивает комфортный микроклимат в подкапюшонной зоне (температура, влажность), снижает вероятность запотевания панорамного защитного экрана. Комфортный микроклимат сохраняется при физических нагрузках и при температуре окружающей среды выше 20–22 °С. Нагрузка на голову человека при использовании данного СИЗ незначительная (при использовании без интегрированной защитной каски). Недостатком является возможность контаминации подкапюшонного пространства при отключении устройства. Подача очищенного воздуха осуществляется только при работе вентиляторов. При безаварийной работе фильтро-вентиляционной установки автономного типа заряда батареи хватает на 8–10 ч [6, 7, 16].

При выборе конструкции СИЗОД необходимо также предусматривать совместимость их с другими видами средств индивидуальной защиты (очки, щитки, косынки, шапочки и др.). Многие производи-

тели выпускают линейку средств защиты, сочетающихся при носке в плане стыковок. Так, например, специальная форма в носовой области респиратора полностью повторяет изгиб защитных очков в области носа, что позволяет избежать наличия незащищенных участков кожи лица и обеспечить более плотное прилегание изделий.

На безопасность проведения работ также оказывают влияние такие характеристики изделий как вес и ограничение поля зрения.

Вес фильтрующих полумасок, в основном не превышает 20 г. Вес фильтрующих СИЗОД с лицевой частью и фильтрующей системой складывается из веса лицевой части и фильтра(ов). Вес полнолицевой маски в среднем составляет 400–600 г. Уменьшить вес возможно при использовании фильтров, заключенных в пластиковый держатель, в отсутствие загрязнения воздуха вредными и опасными газами – не комбинированных, а чисто противоаэрозольных. Для сравнения: вес комбинированного фильтра в металлической коробке для использования с полумаской – 250–300 г, с полнолицевой маской – до 500 г (свыше 500 г должны присоединяться к лицевой части с помощью соединительной трубки), вес комбинированного фильтра в пластиковом корпусе (БРИЗ-3204, 3205, Россия) – 100–140 г, вес противоаэрозольного фильтра РЗ в пластиковом держателе (ЗМ, США) – 40 г.

По сравнению с фильтрующей полумаской в комплекте с защитными закрытыми очками без вентиляции, при использовании панорамной полнолицевой маски и защитного капюшона (шлема) поля зрения увеличены. Однако при эксплуатации панорамной маски следует учитывать такие факторы, как размер, форма и расположение фильтров, которые могут сокращать поля зрения.

Кроме защитной эффективности и эргономических характеристик СИЗОД, немаловажным вопросом является легитимность использования.

Применяемые СИЗОД должны соответствовать требованиям Технического регламента Таможенного союза «О безопасности средств индивидуальной защиты» (ТР ТС 019/2011), утвержден постановлением Правительства РФ от 24.12.2009 г. № 1213, и быть зарегистрированы как СИЗ. СИЗОД, прошедшие оценку соответствия требованиям безопасности, маркируются знаком соответствия или знаком обращения на рынке. СИЗОД, прошедшие оценку соответствия, сопровождаются заверенной копией сертификата соответствия. Сертификация происходит на основе проверки соблюдения требований ГОСТ системы стандартов безопасности труда [37]. В сопроводительных документах на СИЗОД должна быть информация об изготовлении, области безопасного применения средства, правил эксплуатации, ухода, хранения и утилизации. Однако требования ТР ТС 019/2011 не распространяются на СИЗ (в том числе СИЗОД), применяемые в отношении биологически опасных агентов, а область применения существующей в РФ системы стандартов безопасности

труда не распространяется на СИЗОД, специально разработанные для использования в медицинских целях и в микробиологии. Критерии эффективности и вопросы проверки, надевания и снятия, обеззараживания и чистки, согласно ГОСТ, должны быть отражены в инструкции по эксплуатации изделия. Однако часто приводимые сведения не отражают специфику работ с ПБА и требования национальных нормативов по безопасности работ с ПБА, например, в отношении методов и средств обеззараживания. Также до сих пор нет четко установленного порядка получения разрешения использования различных СИЗОД при работе с ПБА. Часто разрешительным инструментом считают наличие протокола исследования испытательных лабораторных центров и аккредитованных организаций, имеющих разрешение на деятельность с ПБА. Несмотря на это современные фильтрующие и изолирующие СИЗОД активно используются при осуществлении различных видов деятельности с возбудителями инфекционных болезней. Достаточно длительный и широкий опыт использования показал, что современные модели СИЗОД высокой степени защиты в комплексе с другими СИЗ обеспечивают безопасность персонала при работе с ПБА, при условии адекватного выбора и правильного использования, а также обучения персонала [19, 36, 38–40].

Таким образом, показано, что кроме обязательных нормируемых требований использования СИЗОД при осуществлении работ с опасными и особо опасными биоагентами (использование изолирующих СИЗ при работах максимальной опасности с ПБА I–II группы и использование фильтрующих СИЗОД в остальных случаях, класс защиты FFP-респираторов не ниже 3, использование панорамных масок, шлемов и капюшонов) существует большое количество моментов, связанных непосредственно с конструктивными особенностями того или иного СИЗОД и организации их использования, которые прямо или косвенно влияют на обеспечение биобезопасности персонала. Часть из них можно охарактеризовать как обязательные к рассмотрению, а часть – как дополнительные необязательные и зависящие, в основном, от финансовых возможностей, например: использование модификаций СИЗОД, усовершенствованных с эргономических позиций, но не теряющих исходных защитных свойств, то есть с уменьшенным весом изделия, фильтрующими материалами с пониженным сопротивлением дыханию, с усовершенствованными клапанами выдоха, потовпитывающей внутренней подкладкой, оснащенные переговорной мембраной и т.п.

На основании анализа изученных информационных источников сделаны следующие выводы:

1. В качестве защиты органов дыхания в составе ПЧК I возможно использование:

- противоаэрозольных (противопылевых) респираторов – фильтрующих полумасок класса защиты FFP 3 или изолирующих полумасок с противо-

аэрозольным или комбинированным фильтром класса защиты P3 (по противоаэрозольному компоненту) в комплексе с защитными очками;

- изолирующей полнолицевой маски или противогаза с противоаэрозольным или комбинированным фильтром(ами) класса защиты P3 (по противоаэрозольному компоненту);

- шлема, капюшона с системой принудительной подачи очищенного воздуха, снабженной противоаэрозольным или комбинированным фильтром класса защиты P3 по противоаэрозольному компоненту;

2. С учетом многообразия типов и модификаций СИЗОД, на рабочем месте необходима разработка программы применения СИЗОД на основе результатов анализа риска. Первоначально с учетом всех возможных вредных и опасных факторов определяют адекватные типы СИЗОД, а затем – наиболее подходящую модификацию для конкретных условий труда (с различной степенью биологической опасности);

3. Рабочие инструкции или СОП должны регламентировать выбор СИЗОД в зависимости от опасности ПБА и опасности манипуляций, проводимых с ними, порядок проведения проверки перед использованием (объем, методы и средства), кратность применения (одноразовое или многоразовое), правила хранения и замены, надевания, снятия и обеззараживания, режим труда, поведение работающих в СИЗОД, действия в аварийных ситуациях.

4. СИЗОД должны подбираться индивидуально и проверяться перед непосредственным использованием. Перед использованием работник должен пройти инструктаж.

5. При выборе фильтрующих полумасок предпочтение следует отдавать респираторам с клапанами выдоха. При использовании фильтрующих СИЗОД эргономически предпочтительно использование противоаэрозольных фильтров в пластиковом держателе, расположение которых не ограничивает поля зрения. При интенсивной физической нагрузке, в условиях повышенной температуры окружающей среды предпочтительно использование фильтрующих СИЗОД с принудительной подачей воздуха.

6. Совершенствование нормирования в области биобезопасности должно быть направлено на внесение ясности в вопросе легитимности использования различных СИЗОД при работе с вредными и опасными биоагентами. Детализация требований должна быть направлена на выбор определенного СИЗОД при различной степени опасности и условиях проведения работ, определение методов и способов проведения проверки защитной эффективности в процессе эксплуатации, определении кратности применения, способов и методов проведения обеззараживания СИЗОД.

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

**Список литературы**

1. Буянов В.В., Супрун И.П. Средства индивидуальной защиты для работ в микробиологических и вирусологических лабораториях. Черноголовка: ИПХФ РАН; 2001. 323 с.
2. Дроздов, С.Г., Гарин Н.С., Джиндоян Л.С., Тарасенко В.М. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. М.: Медицина; 1987. 256 с.
3. Мисников О.П., редактор. Микробные аэрозоли и ингаляционные технологии в медицине. Уфа: Гилем; 2011. 491 с.
4. Малышев В.П., Акимов В.А., Виноградов С.Д., Смагин В.Ф., Осипов Г.Л., Столяров М.Д., Шубин И.Л., Вобликова М.И., Гуняев А.А., Малышев Д.В., Руденко Г.В., Тронин С.Я., Лукичева Т.А., Седов А.В., Суворцев Н.А., Балаханов М.В., Брегадзе Ю.И., Шиллов Н.Д. Коллективные и индивидуальные средства защиты. Контроль защитных свойств: Энциклопедия «Экометрия» из серии справочных изданий по экологическим и медицинским измерениям. М.: ФИД «Деловой экспресс»; 2002. 408 с.
5. Каминский С., Рогожин А. Рекомендации по выбору и применению средств индивидуальной защиты органов дыхания. Гражданская защита. 2009, № 7–9 [Электронный ресурс]. URL: <http://gochs.info/p0897.htm> (дата обращения 30.11.2018).
6. Respiratory Protective Equipment at Work. A Practical Guide. 4th edition. 2013. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.hse.gov.uk/pUbns/priced/hsg53.pdf> (дата обращения 30.11.2018).
7. Руководство NIOSH по респираторной защите в промышленности 1987 г. [Электронный ресурс]. URL: [http://miningwiki.ru/wiki/%D0%A0%D1%83%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE%NIOSH\\_%D0%BF%D0%BE\\_%D1%80%D0%B5%D1%81%D0%BF%D0%B8%D1%80%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%BE%D0%B9\\_%D0%B7%D0%B0%D1%89%D0%B8%D1%82%D0%B5\\_%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BC%D1%8B%D1%88%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%B8\\_1987%D0%B3](http://miningwiki.ru/wiki/%D0%A0%D1%83%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE%NIOSH_%D0%BF%D0%BE_%D1%80%D0%B5%D1%81%D0%BF%D0%B8%D1%80%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%BE%D0%B9_%D0%B7%D0%B0%D1%89%D0%B8%D1%82%D0%B5_%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BC%D1%8B%D1%88%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%B8_1987%D0%B3) (дата обращения 30.11.18 г.)
8. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. Третье издание. Женева: ВОЗ; 2004. 190 с.
9. Васин С.М., Шутов В.С. Управление рисками на предприятии: учебное пособие. М.: КНОРУС; 2010. 304 с.
10. Фатхутдинов Р.Х., Жилиев Г.Т., Моисеенко С.К., Уваев В.В., Иванов Д.В., Тремасов М.Я., Папуниди К.Х. Некоторые вопросы защиты органов дыхания и кожных покровов человека. *Проблемы безопасности и чрезвычайных ситуаций*. 2011; 5:91–103.
11. Фильтрующий материал (фильтр полотно) ФПП-15-1,5 (ткань Петрянова) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.mtk-sorbent.ru/filtruyushchij-material-fpp-15-1-5-tkan-petryanova> (дата обращения 30.11.2018).
12. Фильтры респираторов. [Электронный ресурс]. URL: [https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B8%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D1%8B\\_%D1%80%D0%B5%D1%81%D0%BF%D0%B8%D1%80%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%B2](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B8%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D1%8B_%D1%80%D0%B5%D1%81%D0%BF%D0%B8%D1%80%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%B2) (дата обращения 30.11.2018).
13. Респираторный комплекс. Респираторы серии АЛИНА. [Электронный ресурс]. URL: <http://rkszpe.ru/respirator/alina/> (дата обращения 30.11.2018).
14. АМС-Мед. Респираторы серии АЛИНА (106, 116, 206, 216, 316) и НЕВА (206, 216, 306, 316) [Электронный ресурс]. URL: <http://medams.ru/respirator-alina> (дата обращения 30.11.2018).
15. Worksiz. Респиратор 3М™ VFlex™ 9153RS (Маленький размер). [Электронный ресурс]. URL: [http://worksiz.ru/respirator-3m-vflex-9101-1-1-1-1-1/](http://worksiz.ru/respirator-3m-vflex-9101-1-1-1-1/) (дата обращения 30.11.2018).
16. 3М Средства для обеспечения охраны труда. Каталог продукции 2017 г. [Электронный ресурс]. URL: <https://multimedia.3m.com/mws/media/1548840O/psd-catalogue-rus-2017.pdf> (дата обращения 30.11.2018).
17. Материалы и средства для обеспечения безопасности труда. Схема выбора респираторной защиты. [Электронный ресурс]. 3М Россия, 2014. URL: [www.3MRussia.ru/siz](http://www.3MRussia.ru/siz) (дата обращения 30.11.2018).
18. TB Respiratory Protection Program in Health Care Facilities. Administrator’s Guide. U.S. department of health and human services. Public Health Service. Centers for Disease Control and Prevention. National Institute for Occupational Safety and Health. September 1999. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/99-143/default.html> (дата обращения 30.11.2018).
19. Personal protective equipment for use in a filovirus disease outbreak. Rapid advice guideline. WHO; 2016. [Электронный ресурс]. URL: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/251426/9789241549721-eng.pdf;jsessionid=9F32DE05E856ADC86DB1A96FE91E7099?sequence=1> (дата обращения 30.11.2018).
20. Полумаска ШБ-1-200. [Электронный ресурс]. URL: [https://geosorb.ru/catalog/polumaski\\_filtruyushchie\\_promyshlennye/polumaski\\_filtruyushchie\\_serii\\_1\\_200/](https://geosorb.ru/catalog/polumaski_filtruyushchie_promyshlennye/polumaski_filtruyushchie_serii_1_200/) (дата обращения 30.11.2018).
21. Spirotek spirotek ultra. [Электронный ресурс]. URL: <https://docplayer.ru/36827882-Spirotek-spirotek-ultra.html> (дата

- обращения 30.11.2018).
22. NIOSH-Approved Disposable Particulate Respirators (Filtering Facepieces) CDC. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/sars/> (дата обращения 30.11.2018).
23. Справочник химика 21. Химия и химическая технология. Фильтры Петрянова. [Электронный ресурс]. URL: <http://chem21.info/info/199531/> (дата обращения 30.11.2018).
24. Тихомиров Ю.П., Миронов Л.А., Коробейникова А.В., Егорова Г.И. Повышение эффективности индивидуальной защиты органов дыхания работников медицинских учреждений: Методические рекомендации. СПб.: ЗАО «СЗ НТЦ «Портативные СИЗ» им. А.А. Гуняева»; 2007. 48 с.
25. Чиркин А. Респираторы ШБ «Лепесток». 15 августа 2015. [Электронный ресурс]. URL: [https://library.by/portalus/modules/medecine/readme.php?subaction=showfull&id=1439637380&archive=&start\\_from=&ucat=&](https://library.by/portalus/modules/medecine/readme.php?subaction=showfull&id=1439637380&archive=&start_from=&ucat=&) (дата обращения 28.01.2019).
26. Мухамбетжанов И.Т., Зарипов Ш.Х., Фатхутдинова Л.М., Гришун С.А. Осаждение мелкодисперсных пылевых частиц в дыхательном тракте с использованием средств индивидуальной защиты. *Медицина труда и промышленная экология*. 2017; 7:56–60.
27. Выбор и специфика применения фильтрующих средств индивидуальной защиты органов дыхания. [Электронный ресурс]. URL: <http://otpb.com.ru/content/vybor-i-spezifika-primeneniya-filtruyushchih-sredstv-individualnoy-zashchity-organov> (дата обращения 30.11.2018).
28. Восток Сервис. Маска полная (респиратор) SPIROTEK FM7000. [Электронный ресурс]. URL: <https://shop.vostok.ru/catalog/sredstva-zashchity/zashchita-dyhaniya/filtruyushchie-protivogazovye-i-protivogazovye/maska-polnaya-spirotek-fm7000/> (дата обращения 30.11.2018).
29. ТОЗ. Шлем-маска Маска МГП (МГП-В). [Электронный ресурс]. URL: <http://protivogaz.com/pages/mgp.html> (дата обращения 30.11.2018).
30. Сахно И.И., Сахно В.И. Медицина катастроф (организационные вопросы). М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ; 2002. 560 с.
31. МЧС ГО СИЗ. Панорамная маска МАГ-3. [Электронный ресурс]. URL: <https://gosiz.rf/%D0%9F%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%BD%D0%B0%D1%8F%D0%20%D0%BC%D0%B0%D1%81%D0%BA%D0%B0%20%D0%9C%D0%90%D0%93-3> (дата обращения 30.11.2018).
32. Спецоборона. Палатка для проверки противогазов КПП-1. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.specoborona.ru/advertising/article/8479/> (дата обращения 30.11.2018).
33. Poller B., Hall S., Bailey C., Gregory S., Clark R., Roberts P., Tunbridge A., Poran V., Crook B., Evans C. “VIOLET”: A fluorescence-based simulation exercise for training healthcare workers in the use of personal protective equipment. *J. Hosp. Infect.* 2018; 99(2):229–35. DOI: 10.1016/j.jhin.2018.01.021.
34. Миронов Л.А. Портативная установка «Ингавит», для контроля плотность прилегания лицевой части СИЗОД к лицу пользователя и обнаружения локализации подсоса загрязненного воздуха. *Охрана труда и социальное страхование*. 2006; 2:10–1.
35. SEGMENT. Средства индивидуальной защиты. [Электронный ресурс]. URL: <https://mksegment.ru/p296499812-portativnaya-ustanovka-ingavit.html> (дата обращения 30.11.2018).
36. Clinical management of patients with viral haemorrhagic fever: a pocket guide for front-line health workers: interim emergency guidance for country adaptation. World Health Organization. 2016. [Электронный ресурс]. URL: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205570/9789241549608\\_eng.pdf;jsessionid=A16B8F14DFE9707F60F37BB32E311833?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205570/9789241549608_eng.pdf;jsessionid=A16B8F14DFE9707F60F37BB32E311833?sequence=1) (дата обращения 30.11.2018).
37. Кириллов В. Ф., Чиркин А. В. О респираторной защите работников. *Медицина труда и промышленная экология*. 2016; 9:39–42.
38. Hung P.P., Choi K.S., Chiang V.C. Using interactive computer simulation for teaching the proper use of personal protective equipment. *Comput. Inform. Nurs.* 2015; 33(2):49–57. DOI: 10.1097/CIN.000000000000125.
39. Verbeek J.H., Ijaz S., Mischke C., Ruotsalainen J.H., Mäkelä E., Neuvonen K., Edmond M.B., Sauni R., Kilinc Balci F.S., Mihalache R.C. Personal protective equipment for preventing highly infectious diseases due to exposure to contaminated body fluids in healthcare staff. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 4:CD 011621. DOI: 10.1002/14651858.CD011621.pub2.
40. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Ликвидация эпидемии Эбола в Гвинейской Республике: опыт работы специализированной противозидемической бригады Роспотребнадзора. М.: ООО «Творческий информационно-издательский центр»; 2016. 354 с.

**References**

1. Buyanov V.V., Suprun I.P. [Personal protection equipment for work in microbiological and virological laboratories]. Chernogolovka; 2001. 323 p.

2. Drozdov S.G., Garin N.S., Dzhindoyan L.S., Tarasenko V.M. [Fundamentals of Occupational Safety in Microbiological and Virological Laboratories]. Moscow: "Meditsina"; 1987. 256 p.
3. Misnikov O.P., editor. [Microbial Aerosols and Inhalation Technologies in Medicine]. Ufa: "Gilem"; 2011. 491 p.
4. Malyshev V.P., Akimov V.A., Vinogradov S.D., Smagin V.F., Osipov G.L., Stolyarov M.D., Shubin I.L., Voblikova M.I., Gunyaev A.A., Malyshev D.V., Rudenko G.V., Tronin S.Ya., Lukicheva T.A., Sedov A.V., Surovtsev N.A., Balakhonov M.V., Bregadze Yu.I., Shilov N.D. [Collective and individual protection equipment. Control of protection properties: Encyclopedia "Ecometry", Reference book series on ecological and medical measurements]. Moscow; 2002. 408 p.
5. Kaminsky S., Rogozhin A. [Recommendations on the choice and usage of means for respiratory organs protection. Civil protection. (Grazhdanskaya Zashchita) 2009; No 7-9. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <http://gochs.info/p0897.htm>.
6. Respiratory Protective Equipment at Work. A Practical Guide. 4th edition. 2013. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <http://www.hse.gov.uk/pUbn/priced/hsg53.pdf>
7. [NIOSH Guidelines on respiratory protection in industry, 1987]. (Cited 30 Nov 2018) [Internet]. Available from: <http://miningwiki.ru/wiki/%D0%A0%D1%83%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE%NIOSH%D0%BF%D0%BE%D1%80%D0%B5%D1%81%D0%BF%D0%B8%D1%80%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%BE%D0%B9%D0%B7%D0%B0%D1%89%D0%B8%D1%82%D0%B5%D0%B2%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BC%D1%8B%D1%88%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%B8%1987%D0%B3>.
8. Laboratory Biosafety Manual. 3rd edition. WHO. Geneva; 2004. 190 p.
9. Vasin S.M., Shutov V.S. [Risk management at facility: handbook]. M.; 2010. 304 p.
10. Fathutdinov R.H., Thilyaev G.G., Moiseenko S.K., Ivanov V.V., Uvaev A.V., Tremasov M.Y., Papanidi K.H. [Some questions of human respiratory organs and skin protection]. *Problemy Bezopasnosti i Chrezvychaynykh Situatsii [Safety and Emergencies Problems]*. 2011; 5:91-103.
11. Filtering material (filter-fabric) FPF-15-1,5 (Petryanov's fabric). (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <http://www.mtkSORBENT.ru/filtruyushchij-material-fpp-15-1-5-tkan-petryanova>
12. Respirator filters. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B8%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D1%8B%D1%80%D0%B5%D1%81%D0%BF%D0%B8%D1%80%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%B2>.
13. Respiratory complex. Respirator series "ALINA". (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <http://rkszpe.ru/respirator/alina/>.
14. AMC-Med. Respirator series "ALINA". (106, 116, 206, 216, 316) and "NEVA" (206, 216, 306, 316). (Cited 30 Nov 2018) [Internet]. Available from: <http://medams.ru/respirator-alina>.
15. Worksiz. Respirator 3M™ VFlex™ 9153RS (Small size). (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: [https://worksiz.ru/respirator-3m-vflex-9101-1-1-1-1-1/](https://worksiz.ru/respirator-3m-vflex-9101-1-1-1-1/).
16. 3M Means for ensuring occupational safety. Product Catalogue 2017. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <https://multimedia.3m.com/mws/media/1548840/psd-catalogue-rus-2017.pdf>.
17. [Materials and means for ensuring occupational safety. Scheme for choosing respiratory protection]. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. 3M Russia, 2014. Available from: [www.3MRussia.ru/siz](http://www.3MRussia.ru/siz).
18. TB Respiratory Protection Program in Health Care Facilities. Administrator's Guide. U.S. department of health and human services. Public Health Service. Centers for Disease Control and Prevention. National Institute for Occupational Safety and Health. September 1999. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/99-143/default.html>.
19. Personal protective equipment for use in a filovirus disease outbreak. Rapid advice guideline. World Health Organization; 2016. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/251426/9789241549721-eng.pdf;jsessionid=9F32DE05E856ADC86DB1A96FE91E7099?sequence=1>.
20. Half-Mask ShB-1-200. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: [https://geosorb.ru/catalog/polumaski\\_filtruyushchie\\_promyshlennaya\\_polumaski\\_filtruyushchie\\_serii\\_1\\_200/](https://geosorb.ru/catalog/polumaski_filtruyushchie_promyshlennaya_polumaski_filtruyushchie_serii_1_200/).
21. Spirotek spirotek ultra. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <https://docplayer.ru/36827882-Spirotek-spirotek-ultra.html>.
22. NIOSH-Approved Disposable Particulate Respirators (Filtering Facepieces) CDC. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/sars/>.
23. [Reference Book for Chemists 21. Chemistry and chemical technology. Petryanov's filters]. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <http://chem21.info/info/199531/>.
24. Tikhomirov Yu.P., Mironov L.A., Korobeinikova A.V., Egorova G.I. [Effectiveness enhancement of individual respiratory organs protection in officers of medical institutions: Methodological recommendations]. 2007. 48 p.
25. Chirkin A. Respirators ShB "Lepestok". 15 Aug 2015. (Cited 28 Jan 2019). [Internet]. Available from: [https://library.by/portals/modules/medecine/readme.php?subaction=showfull&id=1439637380&archive=&start\\_from=&ucat=&](https://library.by/portals/modules/medecine/readme.php?subaction=showfull&id=1439637380&archive=&start_from=&ucat=&)
26. Mukhametzanov I.T., Zariyev Sh.Kh., Fatkhutdinova L.M., Grishpun S.A. [Precipitation of finely dispersed dust particles in respiratory tract using personal protection equipment]. *Meditsina Truda i Promyshlennaya Ekologiya [Occupational Medicine and Industrial Ecology]*. 2017; 7:56-60.
27. [Choice and specifics of respiratory filtering equipment application]. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <http://otpb.com.ru/content/vybor-i-spezifika-primeneniya-filtruyushchih-sredstv-individualnoy-zashchity-organov>.
28. "Vostok Servis". Full facial mask (respirator) SPIROTEK FM7000. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <http://shop.vostok.ru/catalog/sredstva-zashchity/zashchita-dyhaniya/filtruyushchie-protivogazovye-i-protivogazoaerozolnye/maska-polnaya-spirotek-fm7000/>.
29. Technologies for Health Protection. Full-face mask. Face piece respirator (Breathing mask). (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <http://protivogaz.com/pages/mgp.html>.
30. Sakhno I.I., Sakhno V.I. [Disaster Medicine (Organizational issues)]. Moscow; 2002. 560 p.
31. Ministry of the Russian Federation for Civil Defense, Emergency Management and Natural Disasters Response PPE. Full-face respirator NBC mask. (Cited 30 Nov 2018). [Internet]. Available from: <https://gocisz.pf/%D0%9F%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%BD%D0%B0%D1%8F%20%D0%BC%D0%B0%D1%81%D0%BA%D0%B0%20%D0%9C%D0%90%D0%93-3>.
32. Special Defense. Tents for gas masks inspection. Checkpoint-1. (Cited 30 Nov 2018) [Internet]. Available from: <https://www.specoborona.ru/advertising/article/8479/>.
33. Poller B., Hall S., Bailey C., Gregory S., Clark R., Roberts P., Tunbridge A., Poran V., Crook B., Evans C. "VIOLET": A fluorescence-based simulation exercise for training healthcare workers in the use of personal protective equipment. *J. Hosp. Infect.* 2018; 99(2):229-35. DOI: 10.1016/j.jhin.2018.01.021.
34. Mironov L.A. [Portable installation "Ingavit", for control of respiratory PPE seal and detection of localization of contaminated air in-leakage]. *Okhrana Truda i Sotsial'noe Strakhovanie. Occupational Health and Social Insurance*. 2006; 2:10-11.
35. SEGMENT. Personal protective equipment. (Cited 30 Nov 2018) [Internet]. Available from: <https://mksegment.ru/p296499812-portativnaya-ustanovka-ingavit.html>.
36. Clinical management of patients with viral haemorrhagic fever: a pocket guide for front-line health workers: interim emergency guidance for country adaptation. World Health Organization. 2016. (Cited 30 Nov 2018) [Internet]. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205570/9789241549608\\_eng.pdf;jsessionid=A16B8F14DFE9707F60F37B32E3111833?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205570/9789241549608_eng.pdf;jsessionid=A16B8F14DFE9707F60F37B32E3111833?sequence=1).
37. Kirillov V.F., Chirkin A.V. [Regarding respiratory protection of personnel]. *Meditsina Truda i Promyshlennaya Ekologiya [Occupational Medicine and Industrial Ecology]*. 2016; 9:39-42.
38. Hung P.P., Choi K.S., Chiang V.C. Using interactive computer simulation for teaching the proper use of personal protective equipment. *Comput. Inform. Nurs.* 2015; 33(2):49-57. DOI: 10.1097/CIN.0000000000000125.
39. Verbeek J.H., Ijaz S., Mischke C., Ruotsalainen J.H., Mäkelä E., Neuvonen K., Edmond M.B., Sauni R., Kilinc Balci F.S., Mihalache R.C. Personal protective equipment for preventing highly infectious diseases due to exposure to contaminated body fluids in healthcare staff. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; 4:CD 011621. DOI: 10.1002/14651858.CD011621.pub2.
40. Popova A.Yu., Kutuyev V.V., editors. [Eradication of Ebola Fever Epidemic in the Republic of Guinea: Operational Experience of the Specialized Anti-Epidemic Team of the Rospotrebnadzor]. Moscow; 2016. 354 p.

#### Authors:

Gordeeva M.V., Lyapin M.N., Kostyukova T.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru).

#### Об авторах:

Гордеева М.В., Ляпин М.Н., Костокова Т.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru).

Поступила 06.02.19.

Принята к публ. 13.05.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-17-25

УДК 616.98:579.841.93

Ю.С. Ковтун, А.А. Курилова, Л.С. Катунина, Е.И. Василенко

**ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА***ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация*

В обзоре приведены данные отечественной и зарубежной литературы о составе и практике применения питательных сред, используемых для диагностики бруцеллеза и производства иммунобиологических препаратов. Рассмотрены питательные среды для культивирования, выделения, накопления, идентификации и дифференциации бруцелл и их L-форм, а также синтетические и транспортные среды. Отмечены положительные и отрицательные стороны части препаратов. Представлены сведения о белковых основах, стимуляторах роста, селективных композициях и других компонентах, входящих в состав сред для диагностики бруцеллеза. Особое внимание уделено селективным средам, истории их развития и совершенствования. Обозначены требования к ингибирующим свойствам данных препаратов, показаны недостатки применения некоторых антимикробных агентов. Указаны питательные среды различного назначения, регламентированные для применения нормативно-методическими документами Российской Федерации, рекомендациями ВОЗ и Всемирной организацией по охране здоровья животных. Приведена информация о принципах оценки качества питательных сред и тест-штаммах, используемых для контроля данных препаратов по ростовым и ингибирующим показателям. Освещены тенденции разработки питательных сред для культивирования и выделения бруцелл, а также методов их применения. Выявлена необходимость проведения исследований в области разработки новых питательных сред для выделения бруцелл из материала, контаминированного посторонними микроорганизмами.

*Ключевые слова:* бруцеллы, питательные среды, культивирование, выделение, идентификация, тест-штаммы.

*Корреспондирующий автор:* Ковтун Юрий Сергеевич, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

*Для цитирования:* Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Катунина Л.С., Василенко Е.И. Питательные среды для диагностики бруцеллеза. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:17–25. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-17-25

Yu.S. Kovtun, A.A. Kurilova, L.S. Katunina, E.I. Vasilenko

**Nutrient Media for Diagnosis of Brucellosis***Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation*

**Abstract.** The overview contains information from Russian and foreign literature about composition and usage of nutrient media for brucellosis diagnosis and immunobiological preparations production. Nutrient media for cultivation, isolation, enrichment, identification and differentiation of *Brucella* and their L-form as well as transport media and synthetic media are considered. Advantages and disadvantages are described for some of the products. The overview also contains information about nutritional bases, growth factors and selective components included in these media. There is a particular focus on selective media, their history and improvement. The article gives the requirements for the inhibitory properties of these products and the disadvantages of using certain antimicrobial agents. The authors list nutrient media for various purposes, certified for use by the Russian regulatory documents, recommendations of World Health Organization and World Organization for Animal Health. Data about principles for assessing the quality of culture media and test strains used to control biological parameters of culture media are covered. The authors also present materials about the trends in nutrient media development for *Brucella* cultivation and isolation, methods of their application. In conclusion, they identify the need to conduct research in the sphere of the development of new nutrient media for *Brucella* isolation from the material contaminated by foreign microorganisms.

*Key words:* *Brucella*, nutrient media, cultivation, isolation, identification, differentiation, test strain.

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

*Corresponding author:* Yury S. Kovtun, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

*Citation:* Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. Nutrient Media for Diagnosis of Brucellosis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:17–25. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-17-25

*Received* 01.10.19. *Revised* 31.10.19. *Accepted* 22.11.19.

Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в России на протяжении последних лет продолжает оставаться напряженной. При наблюдаемом в последние три года снижении количества заболевших бруцеллезом людей многолетняя тенденция неблагополучия по бруцеллезу крупного рогатого скота (КРС) имеет возрастающий характер [1], вследствие чего сохраняется значимость лабораторной диагностики этого заболевания, важным компонентом которой является бактериологический ме-

тод [2–4]. Эффективность данного метода во многом зависит от применяемых питательных сред. Качество питательных сред играет существенную роль также на этапах идентификации и дифференциации выделенных культур, при накоплении биомассы бруцелл в процессе производства вакцин и ряда диагностических препаратов.

**Цель работы** – проведение анализа данных литературы о составе, практике применения и тенденциях разработки питательных сред, используемых

для диагностики бруцеллеза и производства иммунобиологических препаратов.

Основное требование, предъявляемое к питательным средам, независимо от их назначения, состоит в сохранении основных биологических свойств культивируемых микроорганизмов. Другим важнейшим требованием к большинству питательных сред, за исключением транспортных, является обеспечение роста микроорганизмов, т.е. удовлетворение их питательных потребностей, которые, как и условия роста, могут варьировать у представителей разных таксономических групп.

Согласно МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза», возбудители бруцеллеза относятся к семейству *Brucellaceae*, роду *Brucella*, который включает в себя 10 самостоятельных видов, различающихся по биохимическим, метаболическим, антигенным и вирулентным характеристикам: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata*. В последние годы появились сообщения об обнаружении еще двух видов – *B. papionis* и *B. vulpis* [5, 6]. Заболевания людей вызывают преимущественно *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis*, биовары 1–4, реже – *B. canis*.

Бруцеллы грамотрицательны, восстанавливают нитраты (кроме *B. ovis*), ферментируют глюкозу и арабинозу с образованием кислоты, цитрат не утилизируют, индол не образуют, реакции с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра отрицательные. Уреазная активность и продукция сероводорода варьируют у разных видов и штаммов [4, 7]. Указанные свойства микроорганизмов используются при выборе сред для выделения, идентификации и дифференциации бруцелл. Под действием антибактериальной терапии бруцеллы могут трансформироваться в L-формы [8]. Бруцеллы медленно растут на питательных средах. По данным M.J. Corbel, большинство посевов крови является положительными между 7-м и 21-м днем, только 2 % являются положительными после 27-го дня [3]. Лабораторные культуры развиваются быстрее, но все же по скорости роста уступают большинству других микроорганизмов [9].

В диагностической, научной и производственной практике применяются питательные среды, предназначенные для культивирования, выделения, накопления, дифференциальной диагностики, транспортирования и хранения бруцелл.

**Питательные среды для культивирования бруцелл.** Количество питательных сред, предложенных для культивирования всех представителей рода *Brucella* и его отдельных видов, исчисляется десятками. Наиболее удачные из них нашли применение в практической работе микробиологов. В соответствии с МУК 4.2.3010-12 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального

и федерального уровней» с целью проведения лабораторной диагностики бруцеллеза регламентировано применение 22 препаратов, для 6 из которых налажен промышленный выпуск. За рубежом чаще всего применяются сывороточно-декстрозный агар (SDA), коммерческие среды (соево-казеиновый агар, триптозный агар, основа кровяного агара и др.), обогашенные сывороткой, соево-казеиновый и триптозный бульоны [10–12]. Касаясь состава данных сред, следует отметить, что, помимо присутствующего во всех рецептурах хлорида натрия (обычно в концентрации 5,0 г/л) основными компонентами этих препаратов являются белковая основа (или иной источник аминокислот) и стимуляторы роста.

**Белковая основа.** Большинство отечественных сред лабораторного изготовления в качестве питательной основы содержат пептон ферментативный в 1 % концентрации, среда-заменитель «Альбими»-агара – удвоенное количество этого ингредиента. Выпускаемые коммерчески «Питательная среда для выделения и культивирования бруцелл сухая (эритрит агар)» и «Питательная среда для накопления бруцелл сухая (эритрит бульон)» в качестве единственного источника азота включают ферментативный гидролизат кильки. В состав другой, промышленно изготавливаемой в Российской Федерации, среды «Питательный агар для культивирования и выделения возбудителя бруцеллеза сухой (Бруцеллагар)», входят 3 ферментативных перевара: пептон мясной, панкреатические гидролизаты рыбной муки и казеина. В производстве иммунобиологических препаратов традиционно используется перевар Хоттингера – панкреатический гидролизат мяса, в некоторых случаях в смеси с гидролизатами других белковых продуктов [13–15].

В ряде работ показана возможность успешного культивирования бруцелл на таких источниках азотистого питания, как ферментативные гидролизаты крови, желатина, сои, соевого концентрата, глютена кукурузного, рыбной кормовой муки, плацентарно-эмбрионально-маточный гидролизат, дрожжевой автолизат, патока и др. [16–21]. Зарубежные среды аналогичного назначения в качестве белковой основы включают ферментативные гидролизаты казеина, пептические перевары животной ткани, папаиновые перевары соевой муки, бактериологические пептоны и триптозу. Качеству пептонов при этом уделяется повышенное внимание – в некоторых руководствах указаны проверенные, положительно зарекомендовавшие себя компании-производители [3]. Из вышеприведенных данных следует, что спектр белок-содержащих продуктов, служащих для получения источников азотистого питания при культивировании бруцелл, достаточно широк и включает сырье животного и растительного происхождения.

**Стимуляторы роста.** Большинство штаммов бруцелл требуют для своего роста различные аминокислоты, витамины: тиамин, биотин, никотинамид, пантотеновую кислоту и другие соединения,

особенно при первичной изоляции, вследствие чего большинство питательных сред для их культивирования, помимо белковых гидролизатов, содержат экстракты животного, растительного или микробного происхождения, сыворотку, кровь, витамины, углеводы, а также многоатомные спирты [8, 11, 12]. Среди наиболее распространенных – мясные, печеночные и картофельные настои и дрожжевые экстракты. Почти во все рецептуры включена глюкоза в концентрации 1,0–10,0 г/л. В состав эритрит агара, эритрит бульона, бруцеллагара, одного из вариантов триптозного агара/бульона, выпускаемого фирмой HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия), входит тиамин, а в состав первых трех из перечисленных сред – четырехатомный спирт эритрит, являющийся предпочтительным источником энергии для многих штаммов бруцелл [12, 22, 23]. Следует подчеркнуть, что данные о влиянии эритрита на рост бруцелл неоднозначны. Данное соединение стимулировало рост *B. melitensis*, но замедляло рост некоторых других штаммов, в частности, *B. abortus* S 19 [23, 24]. Трехатомный спирт глицерин также нашел применение в качестве стимулятора роста бруцелл, однако в значительно более высоких концентрациях (10–30 г/л), чем эритрит (0,01–0,0122 г/л). Высокие концентрации глицерина (1,0–3,0 %) и глюкозы (0,5–1,5 %), наряду с повышенным содержанием источников азотистого питания, позволяют интенсифицировать получение биомассы бруцелл при производстве иммунобиологических препаратов [14, 25]. В составе бруцеллагара присутствует и стимулятор роста гемофильных микроорганизмов, хотя следует отметить, что бруцеллы для своего роста не нуждаются в гемине и никотинамидадениндинуклеотиде [10]. Содержащиеся в некоторых средах натрий сернистокислый или пироксернистокислый, а также L-цистин могут как регулировать окислительно-восстановительный потенциал, так и служить источниками серы. В рецептуре ряда сред, таких как соево-казеиновый агар/бульон, обогащенный агар/бульон, эритрит агар и эритрит бульон отсутствуют настои или экстракты, однако входящие в них гидролизаты, прежде всего гидролизаты соевой муки и кильки, богаты витаминами, микроэлементами и другими факторами роста [26].

**Синтетические среды.** С первой половины XX в. и до настоящего времени для изучения питательных потребностей, биохимических особенностей бруцелл и их культивирования предложено большое количество синтетических питательных сред. В их рецептуры входила минеральная основа, включающая чаще всего фосфорнокислые соли калия и натрия, сульфаты магния и аммония, хлориды натрия и аммония, органические вещества – глюкозу, глицерин, пируват и цитрат натрия, а также факторы роста – аминокислоты и витамины. Число аминокислот в них варьировало от 1 до 6, наиболее часто встречались L-глутаминовая кислота, L-аргинин, L-гистидин, L-лизин, d,l-метионин, L-цистеин, L-цис-

тин и L-аланин. Комбинации витаминов, как правило, представлены тиамином, никотиновой и пантотеновой кислотами, биотином, рибофлавином, пиридоксином и состояли из 2–6 соединений [27–30]. Ростовые свойства этих сред различались в достаточно большой степени. Препараты различались по количеству вырастающих на них видов и штаммов бруцелл [28, 29, 31]. Посев на большинство синтетических сред осуществлялся с использованием массивных посевных доз ( $2 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^7$  микробных клеток), однако некоторые из препаратов позволяли выявить рост единичных колоний [28, 32]. Эффективность синтетических сред, как правило, была невысока –  $10^7$ – $10^8$  м.к. с 1 мл среды, но в ряде случаев среды позволяли получить с 1 мл до 2,0–19,0 млрд м.к. [27, 29].

Наряду с препаратами для изучения питательных потребностей и культивирования, предложена и синтетическая среда для определения сахаролитической активности бруцелл, которая, по данным авторов, позволяет в короткий срок (48–72 ч) выявить сахаролитические свойства бруцелл, что невозможно при использовании сред Гисса из-за выраженной дезаминирующей активности этих микробов [33].

#### **Питательные среды для выделения бруцелл.**

Выделение возбудителей бруцеллеза из крови, костного мозга, спинномозговой жидкости и других объектов, не содержащих в норме микроорганизмы, проводят с помощью сред для культивирования бруцелл, обладающих хорошими ростовыми свойствами. Добавление инактивированной нагреванием при  $56^\circ\text{C}$  в течение 30 мин сыворотки крови крупного рогатого скота или лошади повышает чувствительность сред к росту бруцелл и необходимо для выделения *B. abortus* 2 биовара и *B. ovis*. Для изоляции этих микроорганизмов из контаминированного материала требуется наличие в питательной среде ингибиторов посторонней микрофлоры, в противном случае последняя подавит рост бруцелл, медленно растущих и взыскательных к источникам питания [23, 34]. Ингибция должна быть комплексной и направленной на угнетение роста грамположительных, грамотрицательных бактерий и микрофлоры [35].

Одним из первых селективных агентов, использованных для выделения *B. abortus*, стал генцианвиолет, который вводился в шоколадный агар или агар, изготовленный на основе печеночного настоя [36, 37]. В дальнейшем С.А. Kuzdas и Е. Morse разработали среду, обозначенную ими как W, усилив ее ингибирующие свойства за счет добавления к 1,4 мг кристаллического фиолетового 6 тыс. единиц полимиксина В сульфата, 100 мг актидиона, 25 тыс. единиц бацитрацина, 15 тыс. единиц циркулина [38]. Предложены варианты этой среды, в которых генцианвиолет заменен на другие красители и исключен циркулин. Один из таких вариантов, содержащий 1,25 мг/л этилвиолета, выпускался фирмами Biolife Italiana S.r.l. и Merck KGaA до недавнего времени. В ходе использования данных сред в практической работе выявилось, что среды, включающие в качестве

селективных агентов красители, не поддерживают рост *B. abortus* биовара 2 и некоторых других видов. L.M. Jones и W.J. Brinley Morgan предложили сывороточный глюкозный агар, на котором наблюдался хороший рост всех штаммов бруцелл, в том числе и рост биовара 2 *B. abortus*. Агар содержал в качестве селективных агентов 25000 МЕ/л бацитрацина, 6000 МЕ/л полимиксина и 4 мг/л амфотерицина [39]. Обладая хорошими вегетирующими свойствами в отношении бруцелл, данная среда была недостаточно селективна, поэтому эффективность выделения бруцелл при ее использовании уступала эффективности биологического метода [11].

Среда, разработанная Ryan, содержала пенициллин, ристоцетин, полимиксин В, налидиксовую кислоту, цетримид, нистатин, циклогексимид и 5 % крови. Эта среда ингибировала рост *B. abortus* biovar 2 и была эффективна только для контроля умеренно загрязнения [40].

Высокоселективную питательную среду, обеспечивающую выделение большого количества штаммов бруцелл, в том числе и *B. abortus* биовара 2, разработал I.D. Farrell [41]. Среда готовится на основе сыворотно-глюкозного агара и содержит 25000 МЕ/л бацитрацина, 20 мг/л ванкомицина, 5000 МЕ/л полимиксина, 5 мг/л налидиксовой кислоты, 100 мг/л циклогексимида и 100000 МЕ/л нистатина. В последствии, ввиду высокой токсичности для человека циклогексимида, последний заменен на натамицин, обладающий сходной антимикотической активностью [42]. Среда Farrell, вероятно, является наиболее широко используемой селективной средой для бактериологической диагностики бруцеллеза, ее применение рекомендовано ВОЗ и Всемирной организацией по охране здоровья животных [3, 4, 43]. Композиции ингибиторов посторонней микрофлоры, включающие как циклогексимид, так и натамицин, выпускаются рядом зарубежных фирм [11, 12]. Вместе с тем, содержащиеся в этой среде бацитрацин и налидиксовая кислота в регламентированных концентрациях сильно ингибируют *B. ovis* и *B. suis*, некоторые штаммы *B. melitensis* и *B. abortus* [43–45].

C.M. Marin *et al.* показали, что модифицированная среда Thayer-Martin более чувствительна к росту бруцелл, чем среда Farrell, а максимальное выделение бруцелл из контаминированного материала наблюдается при одновременном применении этих двух сред [44]. Модифицированная среда Thayer-Martin включает основу питательной среды для культивирования гонококков, гемоглобин – 10 г/л, метансульфонат колистина – 7,5 мг/л, ванкомицин – 3 мг/л, нитрофурантоин – 10 мг/л и нистатин – 12500 МЕ/л. Совместное использование питательных сред рекомендовано для рутинной бактериологической диагностики заболевания [46]. Отрицательными свойствами модифицированной среды Thayer-Martin явились недостаточная селективность и непрозрачность, затрудняющая визуальное наблюдение за морфологией вырастающих колоний [43].

Недостатки модифицированной среды Thayer-Martin устранены De Miguel *et al.* в ходе разработки среды СІТА [43]. С целью повышения прозрачности разработчики исключили из рецептуры гемоглобин и заменили основу питательной среды для культивирования гонококков на основу кровавого агара с добавлением 5 % телячьей сыворотки. Ингибирующие свойства среды усилены за счет увеличения содержания ванкомицина до 20 мг/л и включения в состав препарата 4 мг/л амфотерицина В. Авторы считают, что предложенная ими среда может применяться для успешного выделения всех видов бруцелл из полевых ветеринарных образцов, однако отмечают преимущество одновременного использования СІТА со средой Farrell или модифицированной средой Thayer-Martin для выделения *B. melitensis*, *B. suis* или *B. ovis*. M.S. Karagül и S. İkiz, сравнивая выделение бруцелл с помощью селективных сред Farrell, СІТА, Jones and Morgan, модифицированной среды Thayer-Martin и ингибирующие свойства данных сред в отношении посторонней микрофлоры, также пришли к выводу о предпочтительном использовании двух сред, одной из которых должна быть среда Farrell [47].

В настоящее время совместное применение сред Farrell и СІТА рекомендовано Всемирной организацией по охране здоровья животных [4].

Для выделения бруцелл из контаминированного материала, содержащего малое количество микроорганизмов, ВОЗ и Всемирная организация по охране здоровья животных регламентируют использование бифазной среды, обе фазы которой представляют собой модифицированную среду Brodie and Sinton, содержащую следующую селективную композицию (г/л): полимиксин В сульфат – 6000 МЕ, бацитрацин – 25000 МЕ, натамицин – 50 мг, налидиксовая кислота – 5 мг, амфотерицин В – 1 мг, ванкомицин – 20 мг и Д-циклосерин – 100 мг. Эта среда в большей степени ингибирует рост бактерий *Pseudomonas*, *Proteus*, *Alkaligenes faecalis*, *Bacillus cereus* и *Citrobacter freundii*, чем среда Farrell [3, 4, 48].

В нашей стране в качестве селективных агентов при выделении бруцелл МУК 3.1.7.3402-16 регламентировано применение генцианвиолета в концентрации 5 мг/л и смеси антибиотиков полимиксина – 3 мг/м и амфоглюкамина – 3 мг/л. Из этих двух антибиотиков состоят селективные добавки СД-1 и СД-2, прилагаемые к бруцеллагару производства ФБУН ГНЦ ПМБ. В ветеринарной практике, в соответствии с «Наставлением по диагностике бруцеллеза животных» № 13-5-02/0850 от 29.09.2003 г., нашли применение генцианвиолет и малахитовый зеленый в концентрации 5 мг/л, кристаллвиолет – 10 мг/л, уксуснокислый натрий – 125 мг/л. С целью расширения спектра ингибируемой микрофлоры отечественными исследователями разработан ряд селективных композиций. В.Г. Дальвадянц и В.И. Щедрин, изучая различные концентрации невиврамона, цефокситина, полимиксина, олеандомицина, хлорамфеникола, карбенициллина и генцианвиолета, при помощи со-

четания оптимальных концентраций полимиксина и генцианвиолета выделили культуру бруцелл из суспензии почвенного экстракта, контаминированного штаммами кишечной палочки, бруцелл, протея и стафилококка. Комбинация кристаллического фиолетового и налидиксовой кислоты позволяла при успешном выделении бруцелл ингибировать рост большого числа посторонних микроорганизмов, в частности, видов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Proteus vulgaris* [49]. Для более сильного подавления сопутствующей микрофлоры МУК 4.2.3010-12 предусматривают использование рекомендованной Комитетом экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу прописи модифицированной среды Brodie and Sinton. Вместе с тем следует отметить, что коммерческая добавка по данной рецептуре в нашей стране не выпускается, мы не обнаружили ее и в зарубежных источниках. Составляющие добавку антимикробные соединения малодоступны для практических учреждений, активность данных соединений может сильно варьировать, и для корректного применения необходима отработка рабочей дозы [50].

С целью выделения L-форм бруцелл предложены питательные среды, характеризующиеся повышенным содержанием стимуляторов роста, обязательным наличием нормальной лошадиной сыворотки, L-трансформирующих агентов или селективных агентов в концентрациях, кратно превышающих обычно применяемые при изоляции бруцелл [51]. Так, содержание кристаллического фиолетового, согласно рецептуре среды данного назначения, приведенной в МУК 3.1.7.3402-16, доходит до 30 мг/л, налидиксовой кислоты (в соответствии с патентом РФ 2415918) – до 50 мг/л [52]. Добавление в питательные среды бициллина-3 в концентрациях 3000 ЕД/мл и выше, по данным Л.М. Михайлова и соавт., ингибирует рост бруцелл в S-форме и не влияет на L-форму [53].

Для обеспечения надлежащего качества бактериологических исследований каждая серия среды для выделения и культивирования бруцелл должна контролироваться по биологическим показателям. ВОЗ рекомендует проверку основных сред по их способности поддерживать рост наиболее требовательного к наличию сыворотки штамма *B. abortus* биотипа 2 при малой посевной дозе (5–10 м.к.) [10]. В соответствии с МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза», препараты данного назначения должны оцениваться по показателям чувствительности, прорастания, скорости роста, эффективности и стабильности биологических свойств культур. Испытание осуществляется с помощью тест-штаммов *B. abortus* 19 ВА, *B. melitensis* 16 М и *B. suis* 1330. Для оценки ингибирующих свойств селективной среды в отношении сопутствующей микрофлоры фирма «Oxoid Limited» использует тест-штамм *S. aureus* ATCC 25923, фирма

«HiMedia Laboratories Pvt. Limited» – тот же штамм золотистого стафилококка и дополнительно тест-штамм *E. coli* ATCC 25922 [11, 12]. Аналогичный показатель бруцеллеза контролируется с помощью тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *Candida albicans* 60193, рост которых при посеве 0,1 мл микробной взвеси из разведения  $10^{-4}$  должен полностью подавляться не позднее 48–72 ч инкубации при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

**Среды для идентификации и дифференциации бруцелл.** С целью установления принадлежности выделенной культуры к роду *Brucella* могут быть выполнены соответствующие тесты с использованием следующих питательных сред: глюкозо-пептонной среды – для теста с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра; цитратной среды Козера – с целью определения способности утилизировать цитрат натрия; питательного бульона – для определения индолообразования; глюкозо-пептонной воды с индикатором и поплавком – для обнаружения газообразования; питательного желатина – для выявления протеолитической активности, нитратного бульона – для определения нитратредуктазы. За исключением определения нитратредуктазы (кроме *B. ovis*, не редуцирующей нитрат), положительные результаты остальных тестов, как правило, исключают принадлежность испытываемой культуры к роду *Brucella* [8, 54].

После установления принадлежности к роду для корректного определения видовой принадлежности бруцелл выделенную культуру изучают на наличие диссоциации. Культуру, подвергаемую данному исследованию, рекомендуется выращивать на плотной питательной среде, содержащей 2 % глицерина и 1 % глюкозы [10]. Проведение дифференциации бруцелл по способности образования сероводорода осуществляют с помощью печеночного агара или сывороточно-декстрозного агара [9]. Редуцирующую активность в отношении красок определяют на мясопептонном агаре, агаре Альбими, других агаровых средах для культивирования бруцелл, за исключением сильно пигментированных и непрозрачных [10].

**Транспортные среды.** Используются для доставки биоматериала в специализированные организации. В частности, с указанной целью может использоваться среда Amies [10]. В Российской Федерации Ставропольский противочумный институт выпускает питательную среду жидкую для транспортировки биоматериала и накопления бруцелл (регистрационное удостоверение № РЗН 2013/1153 от 09.09.2013 г.), включающую гидролизат Хоттингера, натрий хлористый, глицерин, глюкозу, натрий лимоннокислый и липоевую кислоту. Среда предназначена для сбора, транспортировки неконтаминированного посторонней микрофлорой биоматериала (кровь, спинномозговая жидкость, костный мозг, желчь), полученного от пациентов, подозрительных на заболевание бруцеллезом, и накопления бруцелл видов *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis*. Препарат разлит в пенициллиновые флаконы, стерилен, готов к упо-

треблению. До транспортировки флаконы с посевами биоматериала допускается хранить в термостате, при комнатной температуре или в холодильнике не более 2 недель.

Из анализа приведенной информации следует, что для культивирования бруцелл предложено большое количество питательных сред, 22 из которых регламентированы нормативными документами, а 6 выпускаются в России промышленным способом. В отечественной лабораторной практике используется также ряд питательных сред зарубежного производства. В качестве белковой основы как российских, так и импортных препаратов применяются: пептон ферментативный, перевары мяса, ферментативный гидролизат кильки, панкреатические гидролизаты рыбной либо соевой муки, казеина и др. Разнообразен спектр стимуляторов роста, используемых в составе питательных сред для культивирования бруцелл, что обусловлено их высокой потребностью в аминокислотах, витаминах, углеводах, микроэлементах и других факторах роста. Синтетические среды, представленные достаточным перечнем и предназначенные, в основном, для изучения питательных потребностей и биохимических свойств возбудителя бруцеллеза, для культивирования сейчас применяются нечасто. Среды для идентификации и дифференциации бруцелл позволяют с помощью специальных тестов установить род и вид выделенных культур.

Ассортимент транспортных бруцеллезных сред не столь обширен, при этом существующие препараты, несмотря на устойчивый спрос, не всегда удовлетворяют требованиям бактериологической практики. Так, например, нет среды для транспортировки биоматериала, подлежащего исследованию на бруцеллез и контаминированного посторонними микроорганизмами. Разработка такой питательной среды необходима. Целесообразными представляются и работы, направленные на расширение спектра транспортных питательных сред для бруцелл, что будет способствовать созданию базы сред выбора и, следовательно, обеспечению непрерывности диагностических исследований в случае непредвиденных затруднений с производством либо наличием того или иного компонента производимых сред.

Питательные среды для выделения возбудителей бруцеллеза из стерильных в норме биологических объектов должны обладать повышенной чувствительностью, для чего в их составе требуется наличие сывороток – лошадиной или КРС. Для выделения L-форм, помимо обогащения сыворотками и стимуляторами роста, необходимо введение L-трансформирующих или селективных агентов в высоких концентрациях. Изоляция бруцелл из контаминированного посторонней микрофлорой материала требует наличия в среде ингибиторов, подбор которых должен учитывать чувствительность к ним как контаминантов, так и самих бруцелл. В настоящее время для повышения числа изолированных культур рекомендуется применять не менее двух сред

с разными комбинациями ингибирующих агентов. В последние годы в России промышленным способом выпускается только одна среда для выделения бруцелл, обладающая недостаточно широким спектром селективного действия. Среди всех разработанных сред данного назначения пока нет единого удобного в применении варианта, который, имея в составе стандартные и доступные компоненты и отвечая основным требованиям к качеству микробиологических сред, полностью удовлетворял бы ростовым потребностям всех культивируемых штаммов бруцелл, не ингибируя их роста, при этом обладал полноценной селективностью и не содержал токсичные для человека ингредиенты.

Таким образом, в условиях сохраняющейся неблагоприятной эпизоотолого-эпидемиологической ситуации в России по бруцеллезу, для его своевременной и качественной лабораторной диагностики необходимо постоянное наличие питательных сред различного назначения, отвечающих всем требованиям, предъявляемым к микробиологическим средам, для чего качеству их должно уделяться повышенное внимание. Наиболее приоритетными к настоящему моменту представляются исследования в области разработки новых сред для изоляции бруцелл из контаминированного посторонними микроорганизмами материала.

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

#### Список литературы

1. Пономаренко Д.Г., Ежлова Е.Б., Русанова Д.В., Хачатурова А.А., Пакскина Н.Д., Бердникова Т.В., Манин Е.А., Семенов О.В., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Анализ эпизоотолого-эпидемиологической обстановки по бруцеллезу в Российской Федерации в 2018 г. и прогноз на 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 2:14–21. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-14-21.
2. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
3. Corbel M.J. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, World Organization for Animal Health. *Brucellosis in humans and animals*. Geneva; 2006. 89 p.
4. World Organization for Animal Health. *Terrestrial Manual*. [Электронный ресурс]. URL: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.04\\_BRUCELOSIS.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELOSIS.pdf) (дата обращения 22.08.2019).
5. Whatmore A.M., Davison N., Cloeckaert A., Al Dahouk S., Zygmunt M.S., Brew S.D., Perrett L.L., Koylass M.S., Vergnaud G., Quance C., Scholz H.C., Dick E.J. Jr., Hubbard G., Schlabritz-Loutsevitch N.E. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014; 64(Pt 12):4120–8. DOI: 10.1099/ijs.0.065482-0.
6. Scholz H.C., Revilla-Fernández S., Al Dahouk S., Hammerl J.A., Zygmunt M.S., Cloeckaert A., Koylass M.S., Whatmore A.M., Blom J., Vergnaud G., Witte A., Aistleitner K., Hofer E. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66(5):2090–8. DOI: 10.1099/ijssem.0.000998.
7. Казанев А.П., Буланьков Ю.И. Бруцеллез. В кн.: Лобзин Ю.В., Жданов К.В., редакторы. Руководство по инфекционным болезням. В 2 кн. Кн. 1. СПб: ООО «Издательство Фолиант»; 2011. С. 389–400.
8. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Бруцеллез у взрослых. Клинические рекомендации. 2014. 71 с.
9. Таран И.Ф., Лямкин Г.И. Бруцеллез (микробиология, иммунология, эпидемиология, профилактика). Ставрополь; 1996. 172 с.
10. Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis. *World*

- Health Organ. Tech. Rep. Ser. 1986; 740:1–132. PMID: 3097967.
11. The OXOID MANUAL. 9th Edition. 2006. 624 p.
  12. Диагностика особо опасных инфекций (ООИ). HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия). [Электронный ресурс]. URL: <http://www.himedialabs.ru/ooi/> (дата обращения 22.08.2019).
  13. Соболев В.В., Мельник Н.В., Скляров О.Д., Тройнин А.С., Зенов Н.И., Климанов А.И., Шумилов К.В., Литенкова И.Ю., Рахманин П.П., Крюков С.В., Тренев В.Н., Соловьев Б.В., Балашов В.Г. Способ получения бруцеллезного антигена из штамма *Brucella abortus* 19 для изготовления единого бруцеллезного антигена для РА, РСК и РДСК, бруцеллезного антигена для розбенгал пробы (РБП) и бруцеллезного антигена для кольцевой реакции (КР) с молоком, способ изготовления бруцеллезной диагностической сыворотки и диагностические наборы. Патент РФ № 2361610, опубл. 20.07.2009 г. Бюл. № 20.
  14. Пяткова Н.В., Суслопаров А.А., Федотов А.К., Юдников В.А., Полищук В.И., Охупкина В.Ю., Дармов И.В. Способ получения биомассы бруцелл вакцинных штаммов при глубинном выращивании с использованием жидкой питательной среды минимизированного состава. Патент РФ 2687373, опубл. 13.05.2019 г. Бюл. № 14.
  15. Кабахова П.М., Хаиров С.Г., Юсупов О.Ю., Яникова Э.А. Сравнительное изучение разных питательных сред для промышленного культивирования бруцелла абортус 19. *Ветеринарная медицина*. 2014; 2:6–8.
  16. Девришов Д.А., Шведов В.В., Шведов Д.В., Бедоева З.М. Сравнительная оценка ростовых свойств производственных культур бруцелл на различных питательных средах. *Ветеринарная медицина*. 2014; 1:19–34.
  17. Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Катунина Л.С., Василенко Е.И. Сравнительная оценка белковых гидролизатов при разработке на их основе питательной среды для культивирования бруцелл. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 4:93–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-93-97.
  18. Мамлеева Н.К., Торбина М.П., Белозерова Г.А. Питательная среда для диагностики бруцеллеза. Авторское свидетельство СССР № 1806186, опубл. 30.03.1993 г. Бюл. № 12.
  19. Зайцева А.И. Изучение эффективности лечебной бруцеллезной вакцины, приготовленной на среде с дрожжевым автолизатом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1961; 1:107–10.
  20. Иванов М.М., Михайлов Н.А. Питательная среда для выращивания микроорганизмов. Авторское свидетельство СССР № 382682, опубл. 23.05.1973 г. Бюл. № 23.
  21. Головнева С.И., Лямкин Г.И., Катунина Л.С., Ляпустина Л.В., Старцева О.Л., Малецкая О.В., Ефременко В.И. Питательная среда для культивирования бруцелл. Патент РФ № 2299238, опубл. 20.05.2007 г. Бюл. № 14.
  22. Tripathi K.K., Bhatnagar L., Seiffge D., Jankowski R.P., Aikins H.E., Gupta K.G. On the growth of *Brucella* species in presence of erythritol in defined and undefined media and amniotic fluid of human, cow and sheep. *Zentralbl. Bakteriol. Orig. A*. 1977; 237(2–3):324–9.
  23. Karagül M.S. Evaluation of adding erythritol to Farrell medium for primary isolation of the *Brucella melitensis* strains. *Kocatepe Vet. J.* 2019; 12(1):75–81. DOI: 10.30607/kvj.494891.
  24. Miranda K.L., Dorneles E.M.S., Poester F.P., Martins Filho P.S., Pauletti R.V., Lage A.P. Different resistance patterns of reference and field strains of *Brucella abortus*. *Braz. J. Microbiol.* 2015; 46(1):265–9. DOI: 10.1590/S1517-838246120130625.
  25. Девришов Д.А., Кабардиев С.Ш., Юсупов О.Ю. Способ изготовления вакцины против бруцеллеза мелкого рогатого скота. Патент РФ № 2642316, опубл. 24.01.2018 г.
  26. Обзор основных компонентов питательных сред. [Электронный ресурс]. Справочник по микробиологии Merck – питательные среды, добавки, экспресс-тесты, пробоотборники воздуха. 679 с. URL: <http://www.dia-m.ru/upload/iblock/34b/Справочник%20по%20микробиологии%20Merck%20-%20питательные%20среды,%20добавки,%20экспресс-тесты,%20пробоотборники%20воздуха,%20русская,%202016%20г.pdf> (дата обращения 22.08.19 г.).
  27. Gerhardt P., Wilson J.B. The nutrition of brucellae: growth in simple chemically defined media. *J. Bacteriol.* 1948; 56(1):17–24. PMID: 16561542. PMID: PMC518538.
  28. Rode L.J., Oglesby G., Schuhardt V.T. The cultivation of brucellae on chemically defined media. *J. Bacteriol.* 1950; 60(5):661–8.
  29. Цыганкова Р.Е., Майский В.Г., Ляпустина Л.В., Лямкин Г.И. Синтетическая питательная среда для выращивания бруцелл. Патент РФ 2148638, опубл. 10.05.2000 г.
  30. Pérez-Etayo L., de Miguel M.J., Conde-Álvarez R., Muñoz P.M., Khamis M., Iriarte M., Moriyón I., Zúñiga-Ripa A. The CO<sub>2</sub>-dependence of *Brucella ovis* and *Brucella abortus* biovars is caused by defective carbonic anhydrases. *Vet. Res.* 2018, 49(1):85. DOI: 10.1186/s13567-018-0583-1.
  31. Меринов С.П., Широков В.А., Голубинский Е.П., Пинигин А.Ф., Петухова О.С. Синтетическая питательная среда для выращивания бруцелл. Авторское свидетельство СССР № 933702, опубл. 07.06.1982 г. Бюл. № 21.
  32. Донской Д.Н., Пинигин А.Ф., Голубинский Е.П., Меринов С.П. Минимальная синтетическая питательная среда для *Brucella*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1983; 11:112.
  33. Алимов А.М., Зайнеев Н.Ш., Салмаков К.М., Хазипов Н.З. Синтетическая среда для определения сахаролитической активности бруцелл. Авторское свидетельство СССР 1210453, опубл. 23.03.1988 г. Бюл. № 11.
  34. Marin C.M., Alabart J.L., Blasco J.M. Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis*, and *B. ovis*. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(2):426–8.
  35. Hornsby R.L. Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. 1998. [Электронный ресурс]. URL: <https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=18852&context=rtcd> (дата обращения 22.08.2019).
  36. Huddleston I., Forrest, Hasley D.E., Torrey J.P. Further studies on the isolation and cultivation of *Bacterium abortus* (Bang). *J. Infect. Dis.* 1927; 40(20):352–68. DOI: 10.1093/infdis/40.2.352.
  37. Henry B.S., Traum J., Haring C.M. Methods for the isolation of *Brucella abortus*. *Hilgardia*. 1932; 6(12):355–79. DOI: 10.3733/hilg.v06n12p355.
  38. Kuzdas C.D., Morse E.V. A selective medium for the isolation of brucellae from contaminated materials. *J. Bacteriol.* 1953; 66(4):502–4. PMID: 13096514. PMID: PMC317420.
  39. Jones L.M., Morgan W.J.B. A preliminary report on a selective medium for the culture of *Brucella*, including fastidious types. *Bull. World Health Organ.* 1958; 19(1):200–3.
  40. The Modification of Technical Annexes of Council Directive 64/432/EEC to take account of Scientific Developments regarding Tuberculosis, Brucellosis and Enzootic Bovine Leucosis. [Электронный ресурс]. URL: [http://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com\\_scah\\_out33\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scah_out33_en.pdf) (дата обращения 22.08.19 г.).
  41. Farell I.D. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res. Vet. Sci.* 1974; 16(3):280–6. DOI: 10.1016/S0034-5288(18)33726-3.
  42. Stack J.A., Harrison M., Perrett L.L. Evaluation of a selective medium for *Brucella* isolation using natamycin. *J. Appl Microbiol.* 2002; 92(4):724–8. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01595.x.
  43. De Miguel M.J., Marin C.M., Munoz P.M., Dieste L., Grillo M.J., Blasco J.M. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(4):1458–63. DOI: 10.1128/JCM.02301-10.
  44. Marin C.M., Jiménez de Bagüés M.P., Barberán M., Blasco J.M. Comparison of two selective media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. *Vet Rec.* 1996; 138(17):409–11. DOI: 10.1136/vr.138.17.409.
  45. Vicente A.F., Antunes J.M.A.P., Lara G.H.B., Mioni M.S.R., Allendorf S.D., Peres M.G., Appolinário C.M., Liston F.J.P., Ribeiro M.G., Megid J. Evaluation of three formulations of culture media for isolation of *Brucella* spp. regarding their ability to inhibit the growth of contaminating organisms. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014:702072. DOI: 10.1155/2014/702072.
  46. World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6th ed. OIE; 2008. P. 628.
  47. Karagül M.S., İkiş S. Comparison of the isolation and inhibition abilities of selective media used for *Brucella* spp. Isolation. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2017; 41:781–6. DOI: 10.3906/vet-1701-50.
  48. Brodie J., Sinton G.P. Fluid and solid media for isolation of *Brucella abortus*. *J. Hyg. (Lond)*. 1975; 74(3):359–67. DOI: 10.1017/s0022172400046878.
  49. Омарова С.М., Ахмедова Э.М., Меджидов Ш.М., Муртузалиева П.М. Питательная среда для выделения бруцелл. Патент РФ № 2266956, опубл. 27.12.2005 г. Бюл. № 36.
  50. Грубер И.М., Мельникова В.А., Шостак О.А., Черкасова Л.С. Специфическая активность селективной питательной среды для выделения бактерий рода *Haemophilus*. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2005; 3:15–7.
  51. Васильев Д.А., Карпунина Л.В., Щербаков А.А., Назарова Л.С., Швиденко И.Г., Золотухин С.Н. L-формы возбудителей зооантропонозов. Ульяновск: изд-во УГСХА им. П.А. Столыпина; 2013. 118 с.
  52. Михайлов Л.М., Маевский М.П., Кузнецов В.И., Калиновский А.И., Татарникова О.Г. Питательная среда для выделения и культивирования L-форм бруцелл. Патент РФ № 2415918, опубл. 10.04.2011 г. Бюл. № 10.
  53. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Баранникова Н.Л., Кузнецов В.И., Атлас А.Г., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Татарникова О.Г., Гордиенко Л.Н., Куликова Е.В., Балаханов С.В. Конструирование питательных сред для бруцелл в L-форме. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; 3:89–93. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-3-89-93.
  54. Geresu M.A., Ameni G., Wubete A., Arenas-Gamboa A.

M., Gezahegne M. K. Isolation and identification of *Brucella* species from dairy cattle by biochemical tests: The first report from Ethiopia. *World Vet. J.* 2016; 6(2):80–8. DOI: 10.5455/wvj.20160471.

## References

- Ponomarenko D.G., Ezhlova E.B., Rusanova D.V., Khachaturova A.A., Pakschina N.D., Berdnikova T.V., Manin E.A., Semenko O.V., Logvinenko O.V., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. Analysis of epizootiological-epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2018 and forecast for 2019. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 2:14–21. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-14-21.
- Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. M.: CJSC «Shiko»; 2013. 560 p.
- Corbel M.J. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, World Organization for Animal Health. *Brucellosis in humans and animals*. Geneva; 2006. 89 p.
- World Organization for Animal Health. *Terrestrial Manual*. [Internet]. (Cited 22 Aug 2019). Available from: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.04\\_BRUCELLOSIS.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLOSIS.pdf).
- Whatmore A.M., Davison N., Cloeckaert A., Al Dahouk S., Zygmunt M.S., Brew S.D., Perrett L.L., Kooyass M.S., Vergnaud G., Quance C., Scholz H.C., Dick E.J. Jr., Hubbard G., Schlabritz-Loutsevitch N.E. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014; 64(Pt 12):4120–8. DOI: 10.1099/ijs.0.065482-0.
- Scholz H.C., Revilla-Fernández S., Al Dahouk S., Hammerl J.A., Zygmunt M.S., Cloeckaert A., Kooyass M.S., Whatmore A.M., Blom J., Vergnaud G., Witte A., Aistleitner K., Hofer E. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66(5):2090–8. DOI: 10.1099/ijsem.0.000998.
- Kazanev A.P., Bulan'kov Yu.I. [Brucellosis]. In: [Guidelines on Infectious Diseases] Lobzin Yu.V., Zhdanov K.V., editors. St. Petersburg: LLC Publishing House "Foliant"; 2011. P. 389–400.
- Ministry of Health of the Russian Federation. [Brucellosis in Adults. Clinical Guidelines]. 2014. 71 p.
- Taran I.F., Lyamkin G.I. [Brucellosis (microbiology, immunology, epidemiology, prophylaxis)]. Stavropol. 1996. 172 p.
- Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 1986; 740:1–132. PMID: 3097967.
- The OXOID MANUAL. 9th Edition. 2006. 624 p.
- [Diagnostics of Particularly Dangerous Infections (PDI)]. HiMedia Laboratories Pvt. Limited (India). [Electronic source]. Available from: <http://www.himedialabs.ru/ooi/> (Cited: August 22, 2019).
- Sobolev V.V., Mel'nik N.V., Sklyarov O.D., Troynin A.S., Zenov N.I., Klimanov A.I., Shumilov K.V., Litenkova I.Yu., Rakhmanin P.P., Kryukov S.V., Trenev V.N., Solov'ev B.V., Balashov V.G. [Method for the production of brucellous antigen from the strain *Brucella abortus* 19 for obtaining universal brucellous antigen for agglutination test, complement fixation test, and prolonged complement fixation test, brucellous antigen for rose bengal test (RBT) and brucellous antigen for ring test with milk, method for the production of brucellous diagnostic serum and diagnostic panels]. RF Patent No2361610, published on July 20, 200, Bulletin No 20.
- Pyatkova N.V., Susloparov A.A., Fedotov A.K., Yudnikov V.A., Polishchuk V.I., Okhapkina V.Yu., Darmov I.V. [Method for the production of biomass from brucellous vaccine strains via submerged cultivation using liquid nutrient medium of minimized composition]. RF Patent No 2687373, published on May 13, 2019, Bulletin No 14.
- Kabakhova P.M., Khairov S.G., Yusupov O.Yu., Yanikova E.A. Comparative study of different nutrient media for commercial cultivation of *Brucella abortus* 19. *Veterinarnaya Meditsina [Veterinary Medicine]*. 2014; 2:6–8.
- Devrishov D.A., Shvedov V.V., Shvedov D.V., Bedoeva Z.M. Comparative assessment of growth properties of production brucella cultures on different nutrient media. *Veterinarnaya Meditsina [Veterinary Medicine]*. 2014; 1:19–34.
- Kovtun Yu. S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. Comparative evaluation of protein hydrolysates in the process of constructing based on them nutrient medium for brucella cultivating. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:93–97. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-93-97.
- Mamleeva N.K., Torbina M.P., Belozeroва G.A. Nutrient medium for diagnostics of brucellosis. Certificate of Authorship of the USSR No 1806186, published on March 30, 1993 Bulletin No12.
- Zaitseva A.I. Assessment of efficacy of therapeutic brucellous vaccine produced on the medium with yeast autolysate. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1961; 1:107–110.
- Ivanov M.M., Mikhailov N.A. Nutrient medium for cultivation of microorganisms. Certificate of authorship of the USSR No 382682, published on May 23, 1973 Bulletin No. 23.
- Golovneva S.I., Lyamkin G.I., Katunina L.S., Lyapustina L.V., Startseva O.L., Maletskaya O.V., Efremenko V.I. Nutrient medium for brucella cultivation. RF Patent No 2299238, published on May 20, 2007 Bulletin No 14.
- Tripathi K.K., Bhatnagar L., Seiffge D., Jankowski R.P., Aikins H.E., Gupta K.G. On the growth of *Brucella* species in presence of erythritol in defined and undefined media and amniotic fluid of human, cow and sheep. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. A.* 1977; 237(2–3):324–9.
- Karagül M.S. Evaluation of adding erythritol to Farrell medium for primary isolation of the *Brucella melitensis* strains. *Kocatepe Vet. J.* 2019; 12(1):75–81. DOI: 10.30607/kvj.494891.
- Miranda K.L., Dorneles E.M.S., Poester F.P., Martins Filho P.S., Pauletti R.B., Lage A.P. Different resistance patterns of reference and field strains of *Brucella abortus*. *Braz. J. Microbiol.* 2015; 46(1):265–9. DOI: 10.1590/S1517-838246120130625.
- Devrishov D.A., Kabardiev S.Sh., Yusupov O.Yu. Method for the production of vaccine against brucellosis of small ruminants. RF Patent No 2642316, published on January 24, 2018.
- Review of the main components of nutrient media. Обзор [Internet]. (Cited 22 Aug 2019). Available from: <http://www.dia-m.ru/upload/iblock/34b/Справочник%20по%20микробиологии%20Merck%20-%20питательные%20среды,%20добавки,%20экспресс-тесты,%20пробирки%20воздуха,%20русс.%20679%20стр..pdf>.
- Gerhardt P., Wilson J.B. The nutrition of brucellae: growth in simple chemically defined media. *J. Bacteriol.* 1948; 56(1):17–24. PMID: 16561542. PMID: PMC518538.
- Rode L.J., Oglesby G., Schuhardt V.T. The cultivation of brucellae on chemically defined media. *J. Bacteriol.* 1950; 60(5):661–8.
- Tsygankova R.E., Maisky V.G., Lyapustina L.V., Lyamkin G.I. Synthetic nutrient medium for brucella cultivation. RF Patent No 2148638, published on May 10, 2000.
- Pérez-Etayo L., de Miguel M.J., Conde-Álvarez R., Muñoz P.M., Khames M., Iriarte M., Moriyón I., Zúñiga-Ripa A. The CO<sub>2</sub>-dependence of *Brucella ovis* and *Brucella abortus* biovars is caused by defective carbonic anhydrases. *Vet. Res.* 2018; 49(1):85. DOI: 10.1186/s13567-018-0583-1.
- Merinov S.P., Shirokov V.A., Golubinsky E.P., Pinigin A.F., Petukhova O.S. Synthetic nutrient medium for brucella cultivation. Certificate of authorship of USSR No 933702, published on June 07, 1982 Bulletin No 21.
- Donskoy D.N., Pinigin A.F., Golubinsky E.P., Merinov S.P. Minimum synthetic nutrient medium for *Brucella*. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology]*. 1983; 60(11):112.
- Alimov A.M., Zaineev N.Sh., Salmakov K.M., Khazipov N.Z. Synthetic medium for determining saccharolytic activity of brucella. Certificate of authorship of the USSR No 1210453, published on March 23, 1988 Bulletin No 11.
- Marin C.M., Alabart J.L., Blasco J.M. Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis*, and *B. ovis*. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(2):426–8.
- Hornsby R.L. Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. 1998. [Internet]. (Cited 22 Aug 2019). Available from: <https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=18852&context=trd>.
- Huddleston I., Forrest, Hasley D.E., Torrey J.P. Further studies on the isolation and cultivation of *Bacterium abortus* (Bang). *J. Infect. Dis.* 1927; 40(20):352–68. DOI: 10.1093/infdis/40.2.352.
- Henry B.S., Traum J., Haring C.M. Methods for the isolation of *Brucella abortus*. *Hilgardia*. 1932; 6(12):355–79. DOI: 10.3733/hilg.v06n12p355.
- Kuzdas C.D., Morse E.V. A selective medium for the isolation of brucellae from contaminated materials. *J. Bacteriol.* 1953; 66(4):502–4. PMID: 13096514. PMID: PMC317420.
- Jones L.M., Morgan W.J.B. A preliminary report on a selective medium for the culture of *Brucella*, including fastidious types. *Bull. World Health Organ.* 1958; 19(1):200–3.
- The Modification of Technical Annexes of Council Directive 64/432/EEC to take account of Scientific Developments regarding Tuberculosis, Brucellosis and Enzootic Bovine Leucosis. [Internet]. (Cited 22 Aug 2019). Available from: [http://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com\\_scah\\_out33\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scah_out33_en.pdf).
- Farell I.D. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res. Vet. Sci.* 1974; 16(3):280–6. DOI: 10.1016/S0034-5288(18)33726-3.
- Stack J.A., Harrison M., Perrett L.L. Evaluation of a selective medium for *Brucella* isolation using natamycin. *J. Appl Microbiol.* 2002; 92(4):724–8. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01595.x.
- De Miguel M.J., Marin C.M., Muñoz P.M., Dieste L., Grillo M.J., Blasco J.M. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J. Clin. Microbiol.*

2011; 49(4):1458–63. DOI: 10.1128/JCM.02301-10.

44. Marin C.M., Jiménez de Bagüés M.P., Barberán M., Blasco J.M. Comparison of two selective media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. *Vet Rec.* 1996; 138(17):409–11. DOI: 10.1136/vr.138.17.409.

45. Vicente A.F., Antunes J.M.A.P., Lara G.H.B., Mioni M.S.R., Allendorf S.D., Peres M.G., Appolinário C.M., Listoni F.J.P., Ribeiro M.G., Megid J. Evaluation of three formulations of culture media for isolation of *Brucella* spp. regarding their ability to inhibit the growth of contaminating organisms. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014:702072. DOI: 10.1155/2014/702072.

46. World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6th ed. OIE; 2008. P. 628.

47. Karagül M.S., İkiz S. Comparison of the isolation and inhibition abilities of selective media used for *Brucella* spp. Isolation. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2017; 41:781–6. DOI: 10.3906/vet-1701-50.

48. Brodie J., Sinton G.P. Fluid and solid media for isolation of *Brucella abortus*. *J. Hyg. (Lond)*. 1975; 74(3):359–67. DOI: 10.1017/s0022172400046878.

49. Omarova S.M., Akhmedova E.M., Medzhidov Sh.M., Murtuzaliev P.M. Nutrient medium for brucella detection. RF Patent No 2266956, published on December 27, 2005 Bulletin No 36.

50. Gruber I.M., Melnikova V.A., Shostak O.A., Cherkasova L.S. The specific activity of selective culture medium for isolation of bacteria of the genus *Haemophilus*. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2005; 3:15–17.

51. Vasil'ev D.A., Karpunina L.V., Shcherbakov A.A., Nazarova L.S., Shvidenko I.G., Zolotukhin S.N. L-forms of the agents of anthroponoses. Ulyanovsk: Publishing house of P.A. Stolypin Ulyanovsk State Agrarian Academy, 2013. 118 p.

52. Mikhailov L.M., Maevsky M.P., Kuznetsov V.I., Kalinovsky A.I., Tatarnikova O.G. Nutrient medium for isolation and cultivation of brucella L-forms. RF Patent No 2415918, published on April 10, 2011 Bulletin No 10.

53. Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Barannikova N.L., Kuznetsov V.I., Atlas A.G., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Tatarnikova O.G., Gordienko L.N., Kulikova E.V., Balakhonov S.V. Construction of nutrient media for L-form brucella. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2012; 3:89–93. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-3-89-93.

54. Geresu M.A., Ameni G., Wubete A., Arenas-Gamboá A. M., Gezahegne M. K. Isolation and identification of *Brucella* species from dairy cattle by biochemical tests: The first report from Ethiopia. *World Vet. J.* 2016; 6(2):80–8. DOI: 10.5455/wvj.20160471.

#### Authors:

Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

#### Об авторах:

Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Катунина Л.С., Василенко Е.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Поступила 01.10.19.

Отправлена на доработку 31.10.19.

Принята к публ. 22.11.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-26-30

УДК 616.932:615.371

Н.И. Белякова, Л.Ф. Ливанова, О.В. Громова, О.С. Дуракова, О.Д. Клокова, К.И. Холматов,  
М.В. Антонычева, З.Л. Девдариани, О.А. Волох

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ СУХОГО ГИДРОЛИЗАТА КАЗЕИНА В ПРОИЗВОДСТВЕ ХОЛЕРНОЙ БИВАЛЕНТНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

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

**Цель** работы – подбор стандартной основы, содержащей сухой гидролизат казеина, для приготовления питательной среды, используемой в производстве вакцины холерной бивалентной химической при глубинном культивировании штаммов холерного вибриона в биореакторах. **Материалы и методы.** В работе использованы штаммы *Vibrio cholerae* O1 классического биовара: 569В серовара Инаба и М-41 серовара Огава. В исследование взяты две сухие основы среды: ферментативный гидролизат казеина Тип I Himedia (Индия) и панкреатический гидролизат казеина ГНЦ ПМБ (Россия). В качестве контроля использована среда лабораторного приготовления РосНИПЧИ «Микроб». Глубинное культивирование проводилось в биореакторах в течение  $(9\pm 1)$  ч с аэрацией и автоматической подкормкой глюкозой и аммиаком. Продукцию протективных антигенов определяли иммунохимическими и биологическими методами. **Результаты и обсуждение.** Показано, что глубинное культивирование производственных штаммов холерного вибриона на питательных средах, приготовленных на всех взятых в исследование основах, обеспечивает синтез протективных антигенов, показатели которых соответствуют требованиям нормативной документации. Более стандартные и высокие показатели целевого продукта обеспечивают культивирование штаммов-продуцентов на питательной среде с основой из сухого ферментативного гидролизата казеина, содержащей  $(1,5\pm 0,1)$  г/л аминного азота для штамма *V. cholerae* М-41 и  $(2\pm 0,1)$  г/л аминного азота для штамма *V. cholerae* 569В. Переход на использование стандартных сухих белковых компонентов сред культивирования не снижает качества вакцины холерной химической, но позволяет снизить ее себестоимость и сократить продолжительность технологического процесса.

**Ключевые слова:** *V. cholerae*, вакцина, питательная среда, глубинное культивирование, протективные антигены.

Корреспондирующий автор: Белякова Нина Ивановна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Белякова Н.И., Ливанова Л.Ф., Громова О.В., Дуракова О.С., Клокова О.Д., Холматов К.И., Антонычева М.В., Девдариани З.Л., Волох О.А. Использование питательной среды на основе сухого гидролизата казеина в производстве холерной бивалентной химической вакцины. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:26–30. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-26-30

N.I. Belyakova, L.F. Livanova, O.V. Gromova, O.S. Durakova, O.D. Klokova, K.I. KholmatoV,  
M.V. Antonycheva, Z.L. Devdariani, O.A. Volokh

## Usage of Nutrient Medium Based on Dry Hydrolysate of Casein in Manufacturing Bivalent Chemical Cholera Vaccine

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

**Abstract. Objective** of the study was to select the standardized substrate containing dry hydrolysate of casein for preparation of nutrient medium utilized for manufacturing bivalent chemical cholera vaccine under submerged cultivation of cholera vibrio strains in fermenters. **Materials and methods.** We used *Vibrio cholerae* O1 strains of classical biovar: strain 569B Inaba and strain M-41 Ogawa. Examined were two dry substrates of the medium: enzymatic hydrolysate of casein, Type I Himedia (India) and pancreatic hydrolysate of casein, produced by the State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology (Russian Federation). Produced under laboratory conditions at the premises of the RusRAPI “Microbe” medium was used as a control. Submerged cultivation was conducted in bioreactors during  $(9\pm 1)$  h with aeration and automatic feeding of glucose and ammonia. Production of protective antigens was measured applying immunochemical and biological methods. **Results and discussion.** It is demonstrated that submerged cultivation of cholera vibrio production strains on nutrient media under study provides for synthesis of protective antigens the parameters of which comply with the requirements of normative documentation. More standardized and higher indicator values of the target product are ensured by cultivation of producer strains on nutrient medium with a substrate from dry enzymatic hydrolysate of casein, containing  $(1.5\pm 0.1)$  g/l of amino nitrogen for the strain *V. cholerae* M-41 and  $(2\pm 0.1)$  g/l – for *V. cholerae* 569 B. Transition to the use of standardized dry protein components of cultivation media does not lower the quality of the chemical cholera vaccine, but allows for the reduction of cost price and duration of technological process.

**Key words:** *V. cholerae*, vaccine, nutrient medium, submerged cultivation, protective antigens.

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

**Corresponding author:** Nina I. Belyakova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Belyakova N.I., Livanova L.F., Gromova O.V., Durakova O.S., Klokova O.D., Kholmatov K.I., Antonycheva M.V., Devdariani Z.L., Volokh O.A. Usage of Nutrient Medium Based on Dry Hydrolysate of Casein in Manufacturing Bivalent Chemical Cholera Vaccine. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:26–30. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-26-30  
Received 19.08.19. Accepted 28.10.19.

На сегодняшний день холера остается одной из важных проблем здравоохранения. В мире ежегодно регистрируется от 1,3 до 2,9 млн случаев заболевания холерой, из которых до 95 тыс. заканчиваются смертью больного [1–3]. Одним из эффективных методов борьбы с холерой является применение оральных холерных вакцин. В настоящее время в мире лицензированы шесть оральных вакцин, обеспечивающих иммунную защиту от холеры [4]. В Российской Федерации зарегистрирована «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые, кишечнорастворимой оболочкой», производства РосНИПЧИ «Микроб» (Россия) [5]. Протективные свойства данной вакцины обеспечиваются двумя активными компонентами: холероген-анатоксином и O1-антигеном [6–8]. Эффективность этой вакцины не уступает широко применяемой во всем мире оральной холерной вакцине Dukoral [4].

Компоненты вакцины холерной бивалентной химической получают из бульонных культур штаммов-продуцентов, выращенных методом глубинного культивирования в биореакторах [6, 7]. Поэтому оптимизация условий роста микробной популяции с целью увеличения синтеза O1-антигена и холерного токсина (ХТ), из которого посредством формоловой детоксикации получают холероген-анатоксин, остается актуальным направлением исследований.

Состав питательной среды играет важную роль в процессе получения антигенных компонентов вакцины, обеспечивающих ее протективные свойства. В настоящее время в процессе глубинного культивирования штаммов холерного вибриона (продуцентов компонентов вакцины холерной) используется питательная среда на основе панкреатического гидролизата казеина (ОРК – основной раствор казеина), приготовленного лабораторным способом. Холерный вибрион выращивают в условиях глубинного культивирования в бульоне из ОРК, содержащем  $(2\pm 0,1)$  г/л аминокислотного азота, до 1 % пептона и имеющем pH  $(8,0\pm 0,1)$  [9]. Изготовление лабораторным способом жидкой основы для среды требует значительных материальных и временных затрат, к тому же гидролизат длительное время хранится при температуре  $(6\pm 2)$  °С, что приводит к накоплению меланинподобного пигмента.

**Цель работы** – подбор стандартной основы, содержащей сухой гидролизат казеина, для приготовления питательной среды, используемой в производстве вакцины холерной бивалентной химической при глубинном культивировании штаммов холерного вибриона в биореакторах.

### Материалы и методы

В работе использованы производственные штаммы *V. cholerae* O1 классического биовара: штамм

569В серовара Инаба и штамм М-41 серовара Огава, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб».

Глубинное культивирование проводилось в биореакторах BioForsPilot 300 в течение  $(9\pm 1)$  ч с аэрацией и автоматической подкормкой глюкозой и аммиаком. Общий расход за цикл составлял в среднем  $(6\pm 2)$  л 40 % раствора глюкозы и  $(0,7\pm 0,1)$  л 10 % раствора аммиака [10].

Для анализа эффективности процесса в исследование взяты следующие среды на основе гидролизата казеина: жидкого основного раствора панкреатического гидролизата казеина лабораторного приготовления (ОРК), сухого ферментативного гидролизата казеина производства Himedia (ФГК), сухого панкреатического гидролизата казеина производства ГНЦ ПБМ Оболенск (ПГК). Все перечисленные среды имели pH  $(8,0\pm 0,1)$  и содержали NaCl – 0,5 %,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0,06 %, пептон до 1 %. Содержание аминокислотного азота в средах составляло:

1. Питательная среда на основе ОРК – аминокислотный азот  $(2\pm 0,1)$  г/л;
2. Питательная среда на основе ПГК (ГНЦ ПБМ) – аминокислотный азот  $(1\pm 0,1)$  г/л;
3. Питательная среда на основе ПГК (ГНЦ ПБМ) – аминокислотный азот  $(2\pm 0,1)$  г/л;
4. Среда на основе ФГК Тип I Himedia – аминокислотный азот  $(2\pm 0,1)$  г/л;
5. Среда на основе ФГК Тип I Himedia – аминокислотный азот  $(1\pm 0,1)$  г/л;
6. Среда на основе ФГК Тип I Himedia – аминокислотный азот  $(1,5\pm 0,1)$  г/л.

Конечную концентрацию микробных клеток в бульонной культуре определяли по отраслевому стандарту мутности (ОСО) бактериальных взвесей 42-28-85П (10 МЕ), эквивалентному  $2,2\cdot 10^9$  м.к. для холерных вибрионов.

Для определения эффективности питательных сред по показателю специфической активности ХТ в работе использовали образцы фильтрата бульонной культуры *V. cholerae* 569В, для определения активности O-антигена использовали формализированные безмикробные центрифугаты бульонной культуры штаммов *V. cholerae* 569В и М-41. Подготовку всех образцов проводили согласно СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

Активность O-антигена в безмикробном центрифугате бульонной культуры производственных штаммов определяли по величине титра в стандартной реакции диффузной преципитации (РДП) с сывороткой диагностической холерной O1 адсорбированной сухой для реакции агглютинации в агаре Дифко (1 % агар Дифко в 0,9 % растворе натрия хлорида, содержащий 0,01 % мертиолята). За титр РДП принимали максимальное разведение препарата, дающее линию

преципитата с холерной О1-сывороткой.

Активность ХТ в фильтрах бульонной культуры штамма *V. cholerae* 569В определяли в реакции пассивного иммунного гемолиза (РПИГ) и кожной пробе Крейга. Для постановки РПИГ использовали чашки Петри с синказным агаром. За титр реакции принимали минимальное разведение образца фильтра бульонной культуры, которое образовывало зону лизиса эритроцитов [11]. Определение активности ХТ по методу Крейга проводили на взрослых кроликах и выражали в минимальной кожной дозе, которая вызывала образование папул (5–10) мм в диаметре [12].

### Результаты и обсуждение

Проведен сравнительный анализ эффективности питательных сред, содержащих жидкую (лабораторного приготовления) или сухую основу с разным содержанием аминного азота, по показателям количества биомассы и специфической активности целевых продуктов (ХТ и О-антиген), полученных из бульонных культур штаммов холерного вибриона, выращенных методом глубинного культивирования.

В процессе культивирования на всех взятых в анализ питательных средах поддерживали одинаковые условия культивирования, разработанные для производственных штаммов *V. cholerae*: поддержание величины рН на уровне (7,5±0,5) в течение первых восьми часов роста и (8,0±0,3) в течение последних двух часов; использование 40 % раствора глюкозы и 10 % раствора аммиака [10]. Первые часы роста культивирование проводили при температуре (36±0,5) °С. Для штамма *V. cholerae* М-41 этот режим сохраняли до конца роста, для штамма *V. cholerae* 569В начиная с 5 ч роста температуру снижали до (33±1,0) °С.

Для сравнения результатов, полученных при выращивании штаммов *V. cholerae* М-41 и 569В на питательных средах с разной основой и отличающихся содержанием аминного азота, учитывали:

- конечную концентрацию микробных клеток в культуре;

- величину титра в стандартной реакции диффузионной преципитации (РДП) с О1-сывороткой.

Кроме того, для сравнения результатов, полученных при выращивании штамма *V. cholerae* 569В на разных питательных средах учитывали:

- максимальное разведение образца фильтра бульонной биореакторной культуры, которое образовывало зону лизиса эритроцитов в РПИГ;

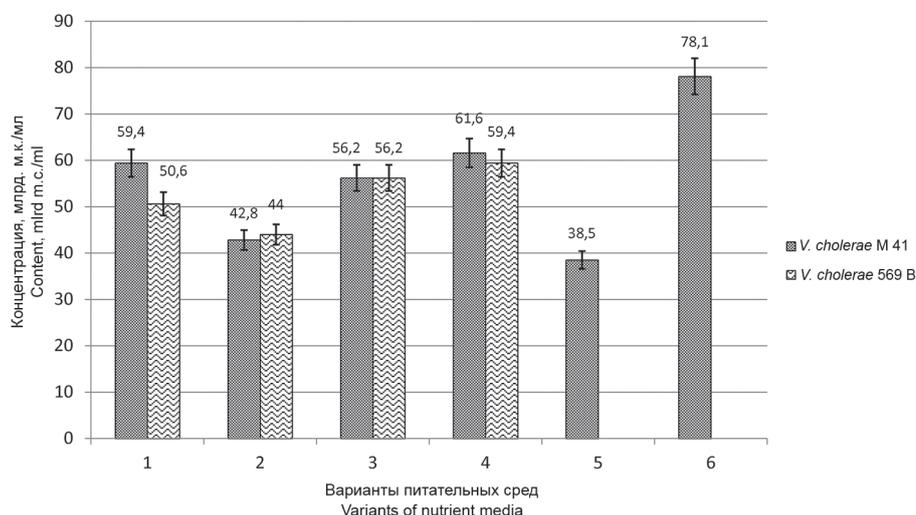
- минимальную кожную дозу фильтра бульонной культуры, которая вызывала образование папул от 5 до 10 мм в диаметре в пробе Крейга.

Анализ полученных результатов показал (рисунок), что конечная концентрация микробных клеток в бульонных культурах, выращенных на всех представленных питательных средах, была не менее (35,0±0,5) млрд м.к./мл. При культивировании штамма *V. cholerae* М-41 данный показатель был выше при использовании среды ФГК Тип I, с содержанием аминного азота (1,5±0,1) г/л. При культивировании штамма *V. cholerae* 569В на аналогичной среде самым высоким этот показатель был при содержании аминного азота (2±0,1) г/л. Снижение аминного азота до (1±0,1) г/л приводило к уменьшению выхода биомассы на (30±1) % для штамма *V. cholerae* М-41 и на (20±1) % для штамма *V. cholerae* 569В.

Показатель содержания О1-антигена в жидких фракциях Огава и Инаба при использовании в процессе культивирования перечисленных выше питательных сред также соответствовал требованиям нормативной документации (реципрокный титр в РДП не ниже 4). При использовании традиционной среды (основа ОРК лабораторного приготовления) данный показатель колебался от 8 до 32 во фракции Огава и стабильно составлял 8 во фракции Инаба (таблица).

При культивировании на среде с основой ФГК Тип I показатель специфической активности О1-антигена по результатам РДП во фракции Огава составлял от 4 до 16 (реципрокный титр), во фракции Инаба – 8.

При культивировании на среде с основой ПГК, содержащей (1±0,1) и (2±0,1) г/л аминного азота, данный показатель активности О1-антигена коле-



Сравнительная характеристика эффективности питательных сред на основе гидролизатов казеина при глубинном культивировании штаммов *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569В:

Варианты питательных сред: 1 – на основе ОРК; 2, 3 – на основе ПГК; 4, 5, 6 – на основе ФГК тип I. Содержание аминного азота (г/л): 1, 3, 4 – по (2±0,1); 2, 5 – (1±0,1); 6 – (1,5±0,1)

Comparative characteristics of efficiency of casein hydrolysate-based nutrient media under submerged cultivation of *V. cholerae* М-41 and *V. cholerae* 569 В strains:

Variants of nutrient media: 1 – basic solution of casein; 2, 3 – based on pancreatic hydrolysate of casein; 4, 5, 6 – based on enzymatic hydrolysate of casein type I. Content of amino nitrogen (g/l): 1, 3, 4 – (2±0.1); 2, 5 – (1±0.1); 6 – (1.5±0.1)

Сравнительная характеристика эффективности питательных сред с разной основой по выходу целевого продукта  
 Comparative characteristics of efficiency of nutrient media with different basis by the target product yield

Среда культивирования на основе гидролизата казеина Cultivation medium based on casein hydrolysate	Содержание О-антигена Огава в жидкой фракции (обратный титр в РДП) Content of O-antigen Ogawa in liquid fraction (reverse titer in diffusion precipitation reaction)	Содержание О-антигена Инаба в жидкой фракции (обратный титр в РДП) Content of O-antigen Inaba in liquid fraction (reverse titer in diffusion precipitation reaction)	Активность холерного токсина Cholera toxin activity	
			РПИГ (обратный титр) passive immune hemolysis test (reverse titer)	реакция Крейга (тыс.) Craig's test (thous.)
ОРК, аминный азот (2±0,1) г/л Basic solution of casein, amino nitrogen (2±0,1) g/l	8–32	8	8–256	16–128
ФГК Тип I, аминный азот (1±0,1) г/л Enzymatic hydrolysate of casein type I, amino nitrogen (1±0,1) g/l	4–8	8	32–256	24–256
ФГК Тип I, аминный азот (1,5±0,1) г/л Enzymatic hydrolysate of casein type I, amino nitrogen (1.5±0,1) g/l	16	не определяли not measured	не определяли not measured	не определяли not measured
ФГК Тип I, аминный азот (2±0,1) г/л Enzymatic hydrolysate of casein type I, amino nitrogen (2±0,1) g/l	16	не определяли not measured	не определяли not measured	не определяли not measured
ПГК ГНЦ ПБМ, аминный азот (1±0,1) г/л Pancreatic hydrolysate of casein (State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology), amino nitrogen (1±0,1) g/l	12–32	4–8	8–16	16–32
ПГК, ГНЦ ПБМ, аминный азот (2±0,1) г/л Pancreatic hydrolysate of casein (State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology), amino nitrogen (2±0,1) g/l	12–32	4–8	8–16	32

бался от 12 до 32 во фракции Огава и от 8 до 16 во фракции Инаба.

Величина титра жидкой фракции Инаба в реакции пассивного иммунного гемолиза (РПИГ) также соответствовала требованиям нормативной документации (обратный титр не ниже 8) при использовании всех взятых в исследование питательных сред: от 8 до 256 на среде с ОРК, от 32 до 256 на среде с основой ФГК Тип I (Himedia) и от 8 до 16 на среде с ПГК (ГНЦ ПБМ). Активность фильтратов бульонных культур штамма *V. cholerae* 569В (ХТ), выращенных на питательных средах, также показала соответствие требованиям нормативной документации (не ниже 2 тыс. единиц) и составила: от 16 тыс. до 128 тыс. на среде с ОРК лабораторного приготовления, от 24 тыс. до 256 тыс. на среде ФГК Тип I (Himedia), от 16 тыс. до 32 тыс. на среде с ПГК (ГНЦ ПБМ), содержащей (1±0,1) г/л аминного азота, и 32 тыс. на среде ПГК (ГНЦ ПБМ), содержащей (2±0,1) г/л аминного азота.

Конечный выход протективных антигенов при выделении их из бульонных культур холерного вибриона, полученных при культивировании на питательных средах, приготовленных на основе гидролизата казеина разных производителей, свидетельствует о целесообразности использования стандартных сухих основ. Так, вес сухой фракции Огава, полученной при культивировании на среде с ФГК Тип I (Himedia), содержащей (1±0,1) г/л аминного азота, в 2 раза превысил вес аналогичной фракции, полученной при культивировании на среде с ОРК, со-

держащей (2±0,1) г/л аминного азота: (735,0±25,0) и (366,0±142,5) г. Для фракции Инаба этот показатель соответственно составил (644,0±44,5) г при культивировании на среде с ФГК Тип I (Himedia), содержащей (1±0,1) г/л аминного азота, и (250,0±136,0) г при культивировании на среде с ОРК, содержащей (2±0,1) г/л аминного азота.

Таким образом, сравнительный анализ показателей количества и активности протективных антигенов, полученных из бульонных культур штаммов холерного вибриона, выращенных методом глубокого культивирования на питательных средах с основой из гидролизата казеина разных производителей показал, что все взятые в исследование среды соответствуют требованиям нормативной документации и могут использоваться в производстве вакцины холерной бивалентной химической. Вместе с тем, более стандартные и высокие показатели целевого продукта обеспечивает культивирование штаммов-продуцентов на питательной среде на основе сухого ферментативного гидролизата казеина, содержащей (1,5±0,1) г/л аминного азота для штамма *V. cholerae* М-41 и (2±0,1) г/л аминного азота для штамма *V. cholerae* 569В, что предполагает преимущественное использование данной среды в производственных целях.

Переход на использование стандартных сухих белковых компонентов сред культивирования позволит снизить себестоимость серий вакцины холерной бивалентной химической и сократить время в процессе ее производства.

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

### Список литературы

1. Ali M., Nelson A.R., Lopez A.L., Sack D.A. Updated global burden of cholera in endemic countries. *PloSNegl. Trop. Dis.* 2015; 9(6):e0003832. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003832.
2. World Health Organization. Cholera, 2015. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2016; 91(38):433–40.
3. World Health Organization. Cholera, 2017. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2018; 93(38):489–500.
4. Горяев А.А., Саяпина Л.В., Обухов Ю.И., Бондарев В.П. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики холеры. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2018; 18(1):42–9. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-42-49.
5. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. Москва; 2018. Т. 1–4.
6. Анисимов П.И., Адамов А.К., Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.П. Способ производства вакцины для профилактики холеры. Патент РФ № 2080121, опубл. 27.05.1997 г.
7. Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.В. Оральная химическая вакцина из гипертоксиогенных штаммов KM76 Инаба и KM68 Огава возбудителя Холеры. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1991; 68(4):31–6.
8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Щуковская Т.Н., Смирнова Н.И., Никифоров А.К., Еремин С.А., Топорков В.П. Специфическая профилактика холеры в современных условиях. *Проблемы особо опасных инфекций,* 2011; 1:5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-5-12.
9. Еремин С.А., Алешина Ю.А., Комиссаров А.В., Громова О.В., Васин Ю.Г., Никифоров А.К., Ливанова Л.Ф., Волох О.А., Лобовикова О.А., Бронникова В.С. Методы и технологии культивирования холерного вибриона (обзор). *Проблемы особо опасных инфекций.* 2013; 4:95–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-95-101.
10. Еремин С.А., Комиссаров А.В., Ливанова Л.Ф., Белякова Н.И., Волох О.А., Васин Ю.Г., Никифоров А.К. Повышение эффективности процесса культивирования производственных штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов протективных антигенов в производстве вакцины холерной химической таблетированной. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Ростов-н/Д: Доницдат; 2013. С. 241–3.
11. Шагинян И.А., Маракуша Б.М. Модификация метода пассивного иммунного гемолиза на плотной среде для выявления продукции термолabileльных энтеротоксинов штаммами холерных вибрионов и кишечной палочки. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1983; 60(2):92–6.
12. Craig J.P., Yamamoto K., Takeda Y., Miwatani T. Production of cholera-like toxin by *V. cholerae* non-O1 strains isolated from environment. *Infect. Immun.* 1981; 34(1):90–7. PMID: 7298194. PMID: PMC350825.

### References

1. Ali M., Nelson A.R., Lopez A.L., Sack D.A. Updated global burden of cholera in endemic countries. *PloSNegl. Trop. Dis.* 2015; 9(6):e0003832. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003832.
2. World Health Organization. Cholera, 2015. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2016; 91(38):433–40.

3. World Health Organization. Cholera. 2017. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2018; 93(38):489–500.
4. Goryaev A.A., Sayapina L.V., Obukhov Yu.I., Bondarev V.P. [Efficiency and safety of the vaccines for cholera prophylaxis]. *BIOPreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie [BIOpreparations. Prophylaxis, Diagnostics, Treatment].* 2018; 18(1):42–9. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-42-49.
5. State Pharmacopeia of the Russian Federation, XIV edition. Moscow; 2018. Vol. 1–4.
6. Anisimov P.I., Adamov A.K., Dzharparidze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.P. [Method for the production of the vaccine for cholera prophylaxis]. RF Patent No 2080121, published on May 27, 1997.
7. Dzharparidze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.V. [Oral chemical vaccines from hyper-toxicogenic strains KM76 Inaba and KM68 Ogawa of cholera agent]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, Immunologii [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology].* 1991; 68(4):31–6.
8. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., Shchukovskaya T.N., Smirnova N.I., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Toporkov V.P. [Cholera Specific Prophylaxis in Modern Conditions]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2011; 1:5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-5-12.
9. Eremin S.A., Alekhina Yu.A., Komissarov A.V., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Nikiforov A.K., Livanova L.F., Volokh O.A., Lobovikova O.A., Bronnikova V.S. [Methods and technologies of cholera vibrio cultivation (Scientific Review)]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2013; 4:95–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-95-101.
10. Eremin S.A., Komissarov A.V., Livanova L.F., Belyakova N.I., Volokh O.A., Vasin Yu.G., Nikiforov A.K. [Effectiveness enhancement of cultivation of *Vibrio cholerae* production strains – producers of protective antigens, in the process of manufacturing of tableted chemical cholera vaccine]. In: [Cholera and Pathogenic for Humans Vibrios]. Rostov-on-Don; 2013. P. 241–3.
11. Shaginyan I.A., Marakusha B.M. [Modification of passive immune hemolysis on solid medium for detection of thermo labile enterotoxin production by cholera vibrio and colibacillus strains]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, Immunologii. [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology].* 1983; 60(2):92–6.
12. Craig J.P., Yamamoto K., Takeda Y., Miwatani T. Production of cholera-like toxin by *V. cholerae* non-O1 strains isolated from environment. *Infect. Immun.* 1981; 34(1):90–7. PMID: 7298194. PMID: PMC350825.

### Authors:

Belyakova N.I., Livanova L.F., Gromova O.V., Durakova O.S., Klokovala O.D., Kholmatov K.I., Antonycheva M.V., Devdariani Z.L., Volokh O.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

### Об авторах:

Белякова Н.И., Ливанова Л.Ф., Громова О.В., Дуракова О.С., Клокова О.Д., Холматов К.И., Антоньчева М.В., Девдариани З.Л., Волох О.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 19.08.19.

Принята к публ. 28.10.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-31-36

УДК 616.98:579.852.11(470.63)

Н.П. Буравцева<sup>1</sup>, В.М. Мезенцев<sup>1</sup>, А.Г. Рязанова<sup>1</sup>, Т.М. Головинская<sup>1</sup>, Д.Ю. Дегтярев<sup>1</sup>, А.Н. Пазенко<sup>2</sup>,  
О.И. Семенова<sup>1</sup>, А.Н. Куличенко<sup>1</sup>

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕОИНФОРМАЦИОННЫХ СИСТЕМ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭЛЕКТРОННОЙ БАЗЫ ДАННЫХ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ ЗАХОРОНЕНИЙ НА ТЕРРИТОРИИ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ

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

<sup>2</sup>Управления ветеринарии Ставропольского края, Ставрополь, Российская Федерация

**Цель.** Использование геоинформационных систем для создания электронной базы данных сибиреязвенных захоронений и электронных кадастров на территории Ставропольского края. **Материалы и методы.** В качестве ГИС-платформы использовали программы ESRI–ArcGIS10. **Результаты и обсуждение.** Проведен ретроспективный анализ эпизоотолого-эпидемиологической обстановки по сибирской язве в Ставропольском крае. Установлено, что 352 стационарно неблагополучных по сибирской язве пункта (СНП) размещены на территории всех 26 районов, в 16 из них расположены 52 бесхозных сибиреязвенных захоронения. Наибольшую эпидемиологическую опасность представляют 22 скотомогильника, в которых захоронены трупы животных (42,3 %). Меньшую потенциальную опасность представляют 30 скотомогильников с зольными захоронениями (57,7 %). Обустройство сибиреязвенных захоронений в Ставропольском крае имеет ряд недостатков – только 23 скотомогильника (44,2 %) имеют удовлетворительное ветеринарно-санитарное состояние. Исходя из полученных сведений, создана электронная геоинформационная база данных сибиреязвенных скотомогильников для каждого района Ставропольского края. Структура базы представлена в виде таблицы, в которую внесены все основные сведения о захоронении, в том числе географические координаты. После этого информация введена в программу ArcGIS10, используя метод привязки по географическим координатам. Каждая точка, нанесенная на карту, несет в себе всю информацию о скотомогильнике, представленную в таблице. Таким образом, создан основной слой геоинформационной системы. На него могут накладываться другие слои, несущие информацию о размещении СНП, характере почвы, объектах, находящихся на данной территории. Помимо этого, созданы электронные атласы-кадастры расположения сибиреязвенных скотомогильников в каждом районе Ставропольского края. Электронные атласы-кадастры более простые в использовании, не требуют специализированного персонала и соответствующей компьютерной ГИС-системы, но в то же время могут дать необходимую информацию о конкретном захоронении на территории Ставропольского края.

**Ключевые слова:** сибирская язва, эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка, стационарно неблагополучный пункт, сибиреязвенные захоронения, сибиреязвенные скотомогильники, атлас-кадастр, геоинформационная база данных.

Корреспондирующий автор: Буравцева Нина Пантелеймоновна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Буравцева Н.П., Мезенцев В.М., Рязанова А.Г., Головинская Т.М., Дегтярев Д.Ю., Пазенко А.Н., Семенова О.И., Куличенко А.Н. Использование геоинформационных систем для создания электронной базы данных сибиреязвенных захоронений на территории Ставропольского края. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:31–36. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-31-36

N.P. Buravtseva<sup>1</sup>, V.M. Mesentsev<sup>1</sup>, A.G. Ryazanova<sup>1</sup>, T.M. Golovinskaya<sup>1</sup>, D.Yu. Degtyarev<sup>1</sup>,  
A.N. Pazenko<sup>2</sup>, O.I. Semenova<sup>1</sup>, A.N. Kulichenko<sup>1</sup>

## Use of Geographic Information Systems for Creation of Electronic Database of Anthrax Burial Sites in the Stavropol Territory

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

**Abstract. Objective** of the study was to use geographic information systems to create an electronic database of anthrax burials and electronic cadastral in the Stavropol Territory. **Materials and methods.** ESRI – ArcGIS10 software was used as a GIS platform. **Results and discussion.** A retrospective analysis of the epizootiologic and epidemiological situation on anthrax in the Stavropol Territory was carried out. It was revealed that 352 anthrax stationary potentially hazardous sites were located in the territory of all 26 districts, in 16 of which 52 were abandoned anthrax burials. The greatest epidemiological risk is posed by 22 cattle burial grounds, in which animal corpses were buried (42.3 %). 30 cattle burial grounds with ash burials (57.7 %) pose a lower potential danger. The arrangement of anthrax burial sites in the Stavropol Territory has a number of disadvantages, only 23 cattle burial grounds (44.2 %) have a satisfactory veterinary and sanitary state. Based on the information obtained, an electronic geographic information database of anthrax cattle burial grounds was created for each district of the Stavropol Territory. The structure of the database is presented in the form of a table, which contains all the basic information about the burial, including geographical coordinates. The information was then entered into the ArcGIS10 program, using the geographical method. Each point, plotted on the map, contains the description of the animal burial ground, presented in the table. Thus, the main layer of the geographic information system is created. It can be overlaid with other layers that carry information about the location of the anthrax stationary potentially hazardous sites, the nature of the soil, objects located in the territory. In addition, electronic cadas-

tral atlases of the location of anthrax cattle burials in each district of the Stavropol territory have been created. Electronic cadastral atlases are easier to use, do not require specialized personnel and applicable computer GIS system, but at the same time can give the necessary information about a particular burial in the Stavropol Territory.

*Key words:* anthrax, epizootiologic and epidemiological situation, stationary potentially hazardous site, anthrax burial sites, anthrax cattle burial grounds, cadastral atlas, geo-information database.

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

*Corresponding author:* Nina P. Buravtseva, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

*Citation:* Buravtseva N.P., Mesentsev V.M., Ryazanova A.G., Golovinskaya T.M., Degtyarev D.Yu., Pazenko A.N., Semenova O.I., Kulichenko A.N. Use of Geographic Information Systems for Creation of Electronic Database of Anthrax Burial Sites in the Stavropol Territory. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:31–36. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-31-36

*Received* 13.09.19. *Accepted* 14.11.19.

Основными причинами, обуславливающими заболеваемость сибирской язвой сельскохозяйственных животных, являются неудовлетворительное ветеринарно-санитарное состояние скотомогильников (СМ), неполный учет сельскохозяйственных животных и их охват вакцинацией, малая изученность распространения сибирской язвы в прошлом, в результате чего многие скотомогильники остаются невыявленными. По данным ветеринарной службы, их число в Российской Федерации на 2013 г. составляло 11308, однако можно не без основания предположить, что реальное количество имеющихся на территории страны скотомогильников значительно превышает эту цифру [1]. Большую роль в активизации сибирезвенных скотомогильников играют работы, связанные с разработкой нефтегазовых месторождений, прокладкой дорожных и железнодорожных магистралей и др. [2, 3].

Ставропольский край до 1960 г. по количеству больных сибирской язвой людей и павших животных на Северном Кавказе занимал одно из первых мест [4]. Длительное время (до 1950 г.) трупы павших от сибирской язвы животных захоранивали в почву. Учитывая особенность микроба образовывать споры, способные в почве сохраняться 100 и более лет, можно предположить, что почвенные сибирезвенные очаги в Ставропольском крае имеют повсеместное распространение [5, 6]. Поэтому не удивительно, что вспышки сибирской язвы среди животных, приводящие зачастую к заболеванию людей, продолжаются и до настоящего времени [7–14].

Опыт работы по паспортизации сибирезвенных захоронений показал, что в большинстве случаев имеющиеся координаты их расположения на местности не соответствуют реальным данным или отсутствуют. Это обуславливает необходимость уточнения географических координат сибирезвенных захоронений, без знания которых довольно сложно планировать проведение профилактических противосибирезвенных мероприятий. Имеющейся на сегодняшний день объем информации требует соответствующей обработки, что невозможно без применения специальных методов исследования и регистрации. К числу таких методов при эпидемиологическом надзоре относятся географические информационные системы (ГИС) [15–18].

**Цель** исследования – использование геоинформационных систем для создания электронной базы

данных и электронных кадастров сибирезвенных захоронений на территории Ставропольского края.

## Материалы и методы

При изучении границ (ареала) территориального распространения сибирезвенных захоронений-скотомогильников для составления базы данных и электронных кадастров использовали ГИС-технологии с построением пространственной модели СМ в виде нозогеографических карт и составлением корреляционного (сопряженного) картографирования. В качестве ГИС-платформы использовали программы ESRI-ArcGIS10. Топографическая основа – электронные карты Ставропольского края М 1:200000, включающие следующие базовые слои: административные границы изучаемого региона, районов, рельеф территории, состав почв, гидрографию, населенные пункты, стационарно неблагополучные по сибирской язве пункты (СНП) и сибирезвенные захоронения. Географические координаты определяли на месте расположения захоронения с помощью навигатора GPS/Глонасс.

## Результаты и обсуждение

По официальным данным ветеринарной службы, в 2011 г. в Ставропольском крае учтено 74 скотомогильника [19]. Проведенный нами анализ показал, что в настоящее время на территории края размещено 52 скотомогильника, что на 22 захоронения меньше официальных данных. Это связано с тем, что в результате реорганизации сельскохозяйственных предприятий (ликвидация колхозов и совхозов) все скотомогильники оказались бесхозными. Они, в основном, были оборудованы много лет назад и в связи с отсутствием «хозяина» пришли в негодность. Количество скотомогильников не находится в каком-либо соответствии с количеством стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов и количеством павших сельскохозяйственных животных в том или ином районе Ставропольского края. В табл. 1 представлены данные по количеству захоронений, СНП и павших животных. Как видно из представленных данных, скотомогильники расположены лишь в 16 районах. Количество их уменьшилось за последние годы в Ипатовском (с 9 до 3), Предгорном (с 8 до 5) и Труновском (с 12 до 0) районах. Существует мне-

ние, что если трупы сибиреязвенных животных утилизировали путем сжигания и эти зольные остатки захоронили в земляные ямы, то такие захоронения опасности не представляют, и, следовательно, ими можно пренебречь. Такое произошло в Труновском районе – все 12 захоронений, которые зарегистрированы в 2011 г., исключены из перечня поднадзорных объектов ветеринарной службы. В некоторых районах, где отмечался большой падеж животных, скотомогильники вовсе отсутствуют: Александровский, Арзгирский, Благодарненский, Кочубеевский, Курский, Новоалександровский, Новоселицкий и Шпаковский районы (табл. 1).

Утилизация трупов животных или их останков является основной характеристикой скотомогильников, по которой можно судить об их потенциальной эпидемической опасности. Нами проведено изучение 52 СМ по способу и кратности захоронения, результаты которых представлены в табл. 2. Наибольшую эпидемическую опасность представляют скотомогильники, в которые захоранивались трупы животных. Таких СМ в Ставропольском крае оказалось 22

(42,3 %). Имеет значение и кратность захоронения. Два и более раз в один и тот же скотомогильник захоранивались трупы животных в 17 СМ (32,7 %).

Меньшую потенциальную опасность представляют скотомогильники с зольными захоронениями, их оказалось 30 (57,7 %). Однако относительно незначительная опасность таких СМ не позволяет пренебречь фактом их существования и исключить подобные захоронения из учета, как это наблюдается в некоторых районах края. Практика показывает, что сожжение трупов животных до зольного остатка наблюдается крайне редко, зачастую на месте сжигания остаются костные останки не полностью сожженных животных. Описаны случаи, когда после сожжения животных и проведения дезинфекционных мероприятий из почвы с места сжигания выделялся возбудитель сибирской язвы [11].

Другими немаловажными факторами, способствующими сохранению эпидемической опасности СМ, являются социальные факторы риска, к которым можно отнести обустройство скотомогильников, условия их содержания, эксплуатации и кон-

Таблица 1 / Table 1

**Сводные данные по количеству стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов, павших животных и сибиреязвенных захоронений на территории Ставропольского края**  
**Summary data on the number of stationary potentially hazardous as regards anthrax area, fallen animals and anthrax burial sites in the Stavropol Territory**

Район / District	Кол-во СНП / Number of stationary potentially hazardous areas	Кол-во павших животных / Number of fallen animals	Кол-во сибиреязвенных захоронений / Number of anthrax burial sites	
			2011	2018
Александровский / Aleksandrovsky	10	947	0	0
Андроповский / Andropovsky	15	192	1	1
Апанасенковский / Apanasenkovsky	11	358	2	2
Арзгирский / Arzgirsky	8	97	0	0
Благодарненский / Blagodarnensky	10	85	0	0
Буденновский / Budennovsky	15	330	1	1
Георгиевский / Georgievsky	14	68	12	10
Грчевский / Grachevsky	12	126	2	2
Изобильненский / Izobil'ensky	26	201	5	6
Ипатовский / Ipatovsky	19	336	9	3
Кировский / Kirovsky	9	175	4	4
Кочубеевский / Kochubeevsky	18	93	0	0
Красногвардейский / Krasnogvardeisky	12	726	1	1
Курский / Kursky	16	48	0	0
Левокумский / Levokumsky	7	398	2	2
Минераловодский / Mineralovodsky	21	74	3	3
Нефтекумский / Neftekumsky	7	313	0	0
Новоалександровский / Novoaleksandrovsky	17	82	0	0
Новоселицкий / Novoselitsky	5	882	0	0
Петровский / Petrovsky	19	686	6	6
Предгорный / Predgorny	19	25	8	5
Советский / Sovetsky	8	78	1	1
Степновский / Stepnovsky	8	23	1	1
Труновский / Trunovsky	14	129	12	0
Туркменский / Turkmensky	16	2459	4	4
Шпаковский / Shpakovsky	16	685	0	0
<i>Итого / Total:</i>	352	9616	74	52

Таблица 2 / Table 2

Классификация сибиреязвенных захоронений в Ставропольском крае в зависимости от степени потенциальной эпидемической опасности  
 Classification of anthrax burial sites in the Stavropol Territory by the degree of potential epidemic hazard

Районы / Districts	Всего захоронений / Total number of burial sites	Вид захоронений / Type of burials		Кратность захоронений / Multiplicity of burials		
		трупы / corpses	зольные остатки / ash residues	1 раз / 1 time	2 раза / 2 times	более 2-х / more than two times
Андроповский / Andropovsky	1	-	1	1	-	-
Апанасенковский / Apanasenkovsky	2	-	2	2	-	-
Буденновский / Budennovsky	1	1	-	1	-	-
Георгиевский / Georgievsky	10	5	5	2	8	-
Грачевский / Grachevsky	2	2	-	2	-	-
Изобильненский / Izobil'nensky	6	1	5	6	-	-
Ипатовский / Ipatovsky	3	-	3	2	1	-
Кировский / Kirovsky	4	-	4	3	1	-
Красногвардейский / Krasnogvardeisky	1	-	1	1	-	-
Левокумский / Levokumsky	2	1	1	1	1	-
Минераловодский / Mineralovodsky	3	3	-	2	1	-
Петровский / Petrovsky	6	6	-	3	3	-
Предгорный / Predgorny	5	1	4	4	-	1
Советский / Sovetsky	1	-	1	1	-	-
Степновский / Stepnovsky	1	-	1	-	1	-
Туркменский / Turkmensky	4	2	2	4	-	-
<i>Итого / Total:</i>	52 (100 %)	22 (42,3 %)	30 (57,7 %)	35 (67,3 %)	16 (30,8 %)	1 (1,9 %)

троля захоронения, рисков для прилегающей территории, а также проживающего населения. При анализе соответствия обустройства скотомогильников ветеринарно-санитарным требованиям учитывали наличие рва вокруг скотомогильника, ограждений, холма на месте захоронения или бетонированной плиты, а также таблички, обозначающей, что это сибиреязвенные захоронения. Обустройство скотомогильников в Ставропольском крае имеет массу недостатков. К примеру, ров вокруг скотомогильника отсутствовал у 42,2 % СМ, ограждения отсутствовали в 60 % случаев, холм – в 16 %, таблички – в 22 %. Если суммировать эти данные, то можно заключить, что только 23 скотомогильника (44,2 %) имели удовлетворительное ветеринарно-санитарное состояние, частично удовлетворительное – 17 СМ (32,7 %), а 12 СМ (23,1 %) не имели ни ограждений, ни рва, ни табличек (табл. 3). Обращали еще внимание на такой важный факт, как расположение скотомогильников возле водоемов и вблизи, или даже в пределах хозяйственных построек. Таких СМ оказалось 12 (23,1 %).

В результате проведенной работы создана электронная база данных сибиреязвенных скотомогильников в Ставропольском крае с помощью геоинформационной системы [20]. Структура базы данных представлена в виде таблицы, где содержатся следующие сведения: номер скотомогильника на географической карте, наименование района, наименование населенного пункта или хозяйства, год захоронения, виды животных и их количество, площадь (м<sup>2</sup>), ветеринарно-санитарное состояние (ров, ограда, холм и табличка), размещение возле водоемов или

хозяйственных построек, хозяйственная принадлежность, географические координаты (широта, долгота) и фотографии. После этого информация введена в программу ArcGIS10. Для наглядного отображения использован метод привязки данных по географическим координатам. В результате на картах с административным делением содержащаяся в базе данных информация отобразилась в виде точек, соответствующих каждому скотомогильнику. Каждая точка, нанесенная на карту, несет в себе всю информацию о скотомогильнике, представленную в таблице. Таким образом, создан основной слой геоинформационной системы. На него могут накладываться другие слои, несущие информацию о размещении СНП, характере почвы, объектах, находящихся на данной территории: коммуникации, промышленные объекты, коммунальное хозяйство, землепользование и др. В процессе создания и наложения слоев друг на друга между ними устанавливаются необходимые связи, что позволяет выполнять пространственные операции с объектами (скотомогильниками) посредством моделирования и интеллектуальной обработки данных. Многослойная организация электронной карты, при наличии гибкого механизма управления слоями, позволяет объединить и отобразить гораздо большее количество информации, чем на обычной карте. Для эффективного управления имеющимися ресурсами, при планировании противосибиреязвенных мероприятий использование ГИС в эпидемиологическом надзоре за сибиреязвенными захоронениями позволит осуществить быструю оценку всего имеющегося объема информации. Кроме того, размещение геоинформационной базы на ArcGIS Server обеспечивает

Таблица 3 / Table 3

Сводные данные по обустройству сибирезвенных захоронений в районах Ставропольского края  
Cumulative data on the arrangement of anthrax burial sites in the districts of the Stavropol Territory

Районы / Name of region	Кол-во захоронений / Number of anthrax burial sites (ABS)	Ветеринарно-санитарное состояние СМ / Veterinary and sanitary condition of BS		
		удовлетворительное / satisfactory	частично удовлетворительное / partially satisfactory	неудовлетворительное / unsatisfactory
Андроповский / Andropovsky	1	-	1	-
Апанасенковский / Apanasenkovsky	2	-	2	-
Буденновский / Budennovsky	1	-	1	-
Георгиевский / Georgievsky	10	10	-	-
Грачевский / Grachevsky	2	-	-	2
Изобильненский / Izobil'nensky	6	2	-	4
Ипатовский / Ipatovsky	3	-	3	-
Кировский / Kirovsky	4	3	1	-
Красногвардейский / Krasnogvardeisky	1	-	-	1
Левокумский / Levokumsky	2	2	-	-
Минераловодский / Mineralovodsky	3	-	-	3
Петровский / Petrovsky	6	4	2	-
Предгорный / Predgorny	5	1	4	-
Советский / Sovetsky	1	1	-	-
Степновский / Stepnovsky	1	-	1	-
Туркменский / Turkmensky	4	-	2	2
<i>Итого / Total:</i>	52 (100 %)	23 (44,2 %)	17 (32,7 %)	12 (23,1 %)

ее сохранность, конфиденциальный доступ и возможности удаленного подключения к ней и использования для просмотра, дополнений и изменений через интернет.

Помимо этого, нами созданы электронные кадастры расположения сибирезвенных скотомогильников в каждом районе Ставропольского края. Электронные кадастры более простые в использовании, не требуют специализированного персонала и соответствующей компьютерной ГИС-системы, но в то же время могут дать необходимую информацию о конкретном захоронении на территории Ставропольского края.

Наличие электронной базы данных и кадастров сибирезвенных скотомогильников позволит ветеринарным службам и администрациям районов в Ставропольском крае обеспечить эпизоотолого-эпидемическую безопасность территорий, прилегающих к сибирезвенным скотомогильникам. Это может быть достигнуто путем исключения или ограничения действия факторов социального риска: недопустимости выпаса скота, размещения рекреационных зон, водозаборов, жилой застройки, проведения строительных и земляных работ вблизи захоронений. С целью недопущения осложнений эпизоотолого-эпидемической ситуации по сибирской язве требуется проводить работу по обустройству захоронений в соответствии с ветеринарно-санитарными требованиями с определением географических координат и поиску «утерянных» сибирезвенных захоронений.

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

Список литературы

1. Симонова Е.Г., Галкин В.В., Локтионова М.Н., Ладный В.И. Сибирезвенные скотомогильники на территории РФ и их биологическая безопасность. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2010; 4:23–6.
2. Галкин В.В., Локтионова М.Н., Симонова Е.Г., Хадарцев О.С. Проблемы безопасности сибирезвенных скотомогильников. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2007; 6:55–7.
3. Симонова Е.Г., Локтионова М.Н., Картавая С.А., Хадарцев О.С. Сибирская язва: оценка эпизоотолого-эпидемиологического риска в Российской Федерации на современном этапе. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013; 2:5–11.
4. Антюганов С.Н., Буравцева Н.П., Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Мезенцев В.М., Аксёнова Л.Ю., Лысогора Е.В., Джаилиди Г.А. Сибирская язва в Ставропольском крае. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2012; 4:67–70.
5. Чуйская Г.Я. Почва как среда сохранения и размножения возбудителя сибирской язвы. Актуальные вопросы профилактики сибирской язвы в СССР. Москва; 1971. 73 с.
6. Ипатенко Н.Г., Седов В.А., Гушин В.Н. Почва – основной резервуар сибирской язвы. В кн.: Биопрепараты, методы их стандартизации и контроля. Москва; 1990. С. 164–9.
7. Феньев В.М. Сибирская язва в Дагестане. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1969; 12:118–21.
8. Бургасов П.Н. Сибирезвенная инфекция. М.: Медицина; 1984. 208 с.
9. Онищенко Г.Г. Об эпизоотологической обстановке по особо опасным, природно-очаговым инфекциям на территории Южного Федерального округа. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2004; 3:23–30.
10. Мицаев Ш.Ш., Буравцева Н.П. Особенности эпизоотического процесса сибирской язвы в Чеченской и Ингушской Республиках. *Ветеринарная патология*. 2008; 1:65–9.
11. Куличенко А.Н., редактор. Сибирская язва на Северном Кавказе. Майкоп: ООО «Качество»; 2016. 198 с.
12. Рязанова А.Г., Семенова О.В., Еременко Е.И., Аксёнова Л.Ю., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая и эпизоотологическая обстановка по сибирской язве в 2017 г., прогноз на 2018 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 1:63–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-63-65.
13. Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю., Колбасов Д.В. Сибирская язва на Ямале: причины возникновения и проблемы диагностики. *Ветеринария*. 2016; 10:3–7.
14. Шестакова И.В. Сибирская язва ошибок не прощает: оценка информации после вспышки на Ямале летом 2016 г. *Журнал инфектологии*. 2016; 8(3):5–27.

15. Черкасский Б.Л., Форстман Д.В., Локтионова М.Н., Шабеikin А.А., Фаизов Т.Х. Опыт использования ГИС-технологий для изучения закономерностей пространственно-временного распределения стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2005; 6:19–23.

16. Попов Н.В., Куклев Е.В., Кутырев В.В. Актуальные вопросы геоинформационного обеспечения мониторинга и прогнозирования эпизоотической активности природных очагов чумы и других зоонозных инфекций на территории Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2006; 1:28–30.

17. Жолдошев С.Т. Современные возможности информационно-аналитической подсистемы эпидемиологического надзора за распространением сибирской язвы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009; 1:17–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-1(99)-17-22.

18. Буравцева Н.П., Антиуганов С.Н., Семенов О.В., Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Куличенко А.Н., Мезенцев В.М. Эпизоотолого-эпидемиологическое районирование территории Северо-Кавказского федерального округа по степени неблагополучия по сибирской язве с использованием программы ArcGIS10. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 3:19–24.

19. Сургучева Л.М., Яременко Н.А., Боровой В.Н. Перечень скотомогильников (в том числе сибирезвенных), расположенных на территории Российской Федерации (Северо-Западный, Южный, Северо-Кавказский федеральные округа). М.: ФГБНУ Росинформагротех; 2011. С. 16–131.

20. Буравцева Н.П., Рязанова А.Г., Мезенцев В.М., Головинская Т.М., Дегтярев Д.Ю., Куличенко А.Н. Электронная база для учета сибирезвенных захоронений животных на территории Российской Федерации с применением географической информационной системы ArcGIS. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 201762151; 2017.

## References

- Simonova E.G., Galkin V.V., Loktionova M.N., Ladnyi V.I. [Anthrax cattle burial grounds in Russia and their biosafety]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology]*. 2010; 4:23–6.
- Galkin V.V., Loktionova M.N., Simonova Ye.G., Khadartsev O.S. [Problems in the safety of anthrax cattle burial grounds]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2007; 6:55–7.
- Simonova E.G., Loktionova M.N., Kartavaya S.A., Hadartsev O.S. [Anthrax: Epizootiological and Epidemiological Risk Assessment in the Russian Federation at the Present Stage]. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2013; 2:5–11.
- Antyuganov S.N., Buravtseva N.P., Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Mezentsev V.M., Aksenova L.Yu., Lysogora E.V., Dzhailedi G.A. [Anthrax in the Stavropol Territory]. *Meditsinskii Vestnik Severnogo Kavkaza [Medical Bulletin of Northern Caucasus]*. 2012; 4:67–70.
- Chuiskaya G.Ya. [Soil as a medium for preservation and proliferation of the anthrax agent. Relevant issues of anthrax prophylaxis in the USSR]. Moscow; 1971. 73 p.
- Ipatenko N.G., Sedov V.A., Gushchin V.N. [Soil – the main reservoir of anthrax]. In: [Biopreparations, Methods of their Standardization and Control]. Moscow; 1990. P. 164–9.
- Fen'ev V.M. [Anthrax in Dagestan]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology]*. 1969; 12:118–21.
- Burgasov P.N. [Anthrax Infection]. Moscow: "Meditsina"; 1984. 208 p.
- Onishchenko G.G. [Concerning epidemiological situation on particularly dangerous, natural-focal infections in the territory of the Southern Federal District]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology]*. 2004; 3:23–30.
- Mitsaev Sh.Sh., Buravtseva N.P. [Peculiarities of epizootic process of anthrax in Chechen Republic and Republic of Ingushetia].

*Veterinarnaya Patologiya [Veterinary Pathology]*. 2008; 1:65–9.

11. Kulichenko A.N., editor. [Anthrax in Northern Caucasus]. Maikop: "Kachestvo" Ltd.; 2016. 198 p.

12. Ryazanova A.G., Semenova O.V., Eremenko E.I., Aksenova L.Y., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Kulichenko A.N. [Epidemiological and epizootiological situation on anthrax in 2017, forecast for 2018]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 1:63–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-63-65.

13. Selyaninov Yu.O., Egorova I.Yu., Kolbasov D.V. [Anthrax in Yamal: causes of emergence and problems of diagnostics]. *Veterinariya [Veterinary]*. 2016; 10:3–7.

14. Shestakova I.V. [Anthrax is unforgiving: assessment of the information after the outbreak in Yamal, in the summer of 2016]. *Zhurnal Infektsionnoi [Journal of Infectology]*. 2016; 8(3):5–27.

15. Cherkassky B.L., Fortsman D.V., Loktionova M.N., Shabeikin A.A., Faizov T.Kh. [Experience in using GIS technologies for studies of regularities of spatial-temporal distribution of stationary potentially hazardous as regards anthrax areas]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2005; 6:19–23.

16. Popov N.V., Kouklev E.V., Kutyrev V.V. [Actual issues of geoinformational support to provide for monitoring and prognostication of epizootic activity in natural foci of plague and other zoonotic infections in the territory of the Russian Federation]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2006; 1:28–30.

17. Zholdoshev S.T. [Modern opportunities of informational and analytical subsystem for epidemiological surveillance of anthrax distribution (Analytical Review)]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2009; 1:17–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-1(99)-17-22.

18. Buravtseva N.P., Antyuganov S.N., Semenov O.V., Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Kulichenko A.N., Mezentsev V.M. [Epizootiological-epidemiological zoning of the territory of North-Caucasian Federal District by the degree of hazard as regards anthrax using ArcGIS10 software]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology]*. 2016; 3:19–24.

19. Surgucheva L.M., Yaremenko N.A., Borovoi V.N. [List of cattle burials (including anthrax ones) situated in the territory of the Russian Federation (North-Western, Southern, North-Caucasian, Federal Districts)]. Moscow: Federal state budgetary scientific institution "Rosinformagrotekh"; 2011. P. 16–131.

20. Buravtseva N.P., Ryazanova A.G., Mezentsev V.M., Golovinskaya T.M., Degtyarev D.Yu., Kulichenko A.N. [Electronic database for registering anthrax animal burials in the territory of the Russian Federation using geographical information system ArcGIS]. Certificate of the State Registration of database No 201762151; 2017.

## Authors:

Buravtseva N.P., Mesentsev V.M., Ryazanova A.G., Golovinskaya T.M., Degtyarev D.Yu., Semenova O.I., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Pazenko A.N. Veterinary Administration of the Stavropol Territory. Stavropol, Russian Federation. E-mail: info@vetstav.ru.

## Об авторах:

Буравцева Н.П., Мезенцев В.М., Рязанова А.Г., Головинская Т.М., Дегтярев Д.Ю., Семенова О.И., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Пазенко А.Н. Управление ветеринарии Ставропольского края. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Мира, 337. E-mail: info@vetstav.ru.

Поступила 13.09.19.

Принята к публ. 14.11.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-37-40

УДК 616.98:579.842.23

С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Г.Ф. Иванова, Л.С. Катунина, Д.В. Ростовцева, А.В. Костромин

**МОНИТОРИНГ СТАБИЛЬНОСТИ ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ ЖИВОЙ, ПРИГОТОВЛЕННОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТА КУКУРУЗНОГО ЭКСТРАКТА СГУЩЕННОГО***ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация*

**Цель** исследования – проанализировать стабильность препарата вакцины чумной живой, изготовленного с использованием экспериментальной питательной среды в течение срока годности. **Материалы и методы.** В работе изучены серии вакцины чумной живой на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, изготовленные с использованием экспериментальной питательной среды. Исследовали наиболее значимые параметры качества препарата согласно спецификации: концентрация микробных клеток, процент живых микробных клеток, термостабильность, потеря в массе при высушивании и иммуногенность. **Результаты и обсуждение.** Проведен мониторинг стабильности вакцины, изготовленной с использованием питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного, в течение установленного срока годности (три года). Сравнительный анализ жизнеспособности всех экспериментальных серий вакцины проведен в определенные временные промежутки – краткосрочное хранение (до 3 месяцев) и до истечения срока годности. За время хранения наблюдалось незначительное снижение процента живых микробных клеток, при этом ни в одной серии уменьшение жизнеспособности ниже регламентированного уровня (25 %) не произошло. Такое снижение закономерно для «живого препарата» и не является критическим в полученных пределах. Остальные исследуемые показатели практически не претерпели изменений. Таким образом, анализ полученных данных свидетельствует о том, что во все изученные сроки препарат сохраняет стабильность основных регламентированных показателей. Проведенные исследования подтверждают целесообразность использования предложенной питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного в промышленном производстве препарата вакцины чумной живой.

**Ключевые слова:** вакцина чумная живая, качество препарата, стабильность, жизнеспособность, термостабильность.

*Корреспондирующий автор:* Гостищева Светлана Евгеньевна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

*Для цитирования:* Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Катунина Л.С., Ростовцева Д.В., Костромин А.В. Мониторинг стабильности вакцины чумной живой, приготовленной с использованием питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 4:37–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-37-40

S.E. Gostishcheva, N.V. Abzaeva, G.F. Ivanova, L.S. Katunina, D.V. Rostovtseva, A.V. Kostrominov

**Monitoring of Stability of the Live Plague Vaccine Produced Using Condensed Corn Steep Extract Hydrolysate-Based Nutrient Medium***Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation*

**Abstract. Objective** of the study was to analyze the stability of the preparation of a live plague vaccine made using an experimental nutrient medium over its shelf life. **Materials and methods.** A series of live plague vaccine based on *Yersinia pestis* EV NIEG strain produced using experimental nutrient medium were utilized in this work. Most significant qualitative parameters of the preparation were studied: microbe cell content, viability, thermal stability, mass loss during the process of drying, and immunogenicity. **Results and discussion.** The stability of the vaccine produced using the nutrient medium based on hydrolysate of condensed corn steep extract was monitored over a specified shelf life (three years). A comparative analysis of the viability of all experimental vaccine series was carried out at certain time intervals – short-term storage (up to 3 months) and before the expiration date. During storage, there was an insignificant decrease in the percentage of living microbial cells, while in no series the viability decrease reached below the regulated levels of 25 %. Such a decrease is natural for a “live preparation” and is not critical within the obtained limits. The rest of the studied indicators practically did not change. Thus, the analysis of the data obtained indicates that in all the periods of observation the drug retained the stability of the main regulated indicators. The studies confirm the feasibility of using this referred nutrient medium based on hydrolyzed corn steep extract in industrial production of the plague live vaccine preparation.

**Key words:** live plague vaccine, preparation quality, stability, viability, thermostability.

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

**Corresponding author:** Svetlana E. Gostishcheva, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

**Citation:** Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Katunina L.S., Rostovtseva D.V., Kostrominov A.V. Monitoring of Stability of the Live Plague Vaccine Produced Using Condensed Corn Steep Extract Hydrolysate-Based Nutrient Medium. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:37–40. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-37-40

Received 27.08.19. Revised 26.09.19. Accepted 14.11.19.

С целью специфической профилактики чумы в России применяют вакцину чумную живую из вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ [1–3]. В биотехнологии приготовления препарата на

этапе накопления биомассы в биореакторе (АКМ-Ш) используются питательные среды на основе гидролизатов Хоттингера или казеина, оптимальные для культивирования микроорганизмов и стабилизации количества живых микробных клеток при хранении вакцины (Промышленный регламент на производство ПР 01897080-09-16) [4–6].

Важным требованием при изготовлении живых вакцин является обеспечение сохранения качества препарата в течение длительного времени, то есть стабильность показателей в соответствии с установленной спецификацией (Фармакопейная статья предприятия ФСП 42-8654-07) [7–9].

Стабильность (устойчивость) лекарственных средств – это способность сохранять физико-химические свойства и фармакологическую активность, предусмотренные требованиями нормативной документации (НД) в течение установленного срока годности (ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств») [10–12].

На стабильность вакцины чумной живой значительное влияние оказывают условия культивирования штамма *Yersinia pestis* EV и последующей лиофилизации, а также транспортирование и хранение готового препарата [13–15]. Одним из основных требований получения высокоэффективного вакцинного препарата является использование в производстве качественной питательной среды, обеспечивающей стабильный выход биомассы. Микробная популяция на этапах получения генераций посевных культур испытывает ряд неблагоприятных воздействий и может содержать не только биологически неполноценные (незрелые), но и поврежденные микробные клетки, что является одной из причин их гибели в процессе лиофилизации [16, 17]. Для сохранения большего процента жизнеспособных клеток в вакцине при лиофилизации применяют стабилизатор (среда высушивания), обеспечивающий стабильность свойств препарата в течение срока годности. Следует отметить, что в соответствии с регламентированными требованиями вакцины хранят при температуре от 2 до 8 °С. Кроме этого, соблюдение требований «холодовой цепи» является обязательным при транспортировке для обеспечения безопасности и сохранности качества препарата (СП 3.3.2.3332-16 «Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов»).

Ранее нами в качестве сырья для приготовления питательных сред в производстве вакцины чумной живой апробирован гидролизат кукурузного экстракта сгущенного (ГКЭС) [18]. Вакцина чумная живая, приготовленная на этой питательной среде, по всем регламентированным свойствам соответствовала требованиям НД.

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ для подтверждения сохранности свойств лекарственных препаратов в течение гарантированного срока годности, необходимо проводить долгосрочные исследования стабильности готовых

серий вакцины чумной живой [19].

**Цель** исследования – проанализировать стабильность препарата вакцины чумной живой, изготовленного с использованием питательной среды ГКЭС в течение срока годности.

### Материалы и методы

В работе использованы восемь серий вакцины чумной живой на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, изготовленные с использованием питательной среды ГКЭС.

Стабильность экспериментальных серий вакцины исследована по основным показателям спецификации: жизнеспособность и термостабильность (бактериологический метод), потеря в массе при высушивании (гравиметрический метод), иммуногенность (биологический метод) в соответствии с ФСП 42-8654-07.

Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Экспериментальные серии вакцины чумной живой проверили на соответствие требованиям спецификации НД при выпуске. Все образцы при исследовании соответствовали требованиям, предъявляемым к готовому препарату вакцины чумной живой.

Далее в течение срока хранения (три года) провели исследование стабильности полученных серий по основным показателям качества: специфическая активность (процент живых микробных клеток и концентрация микробных клеток) иммуногенность, термостабильность, потеря в массе при высушивании согласно ФСП 42-8654-07 (таблица).

Из данных, представленных в таблице, видно, что за время хранения наблюдается снижение процента живых микробных клеток. Остальные свойства вакцины при хранении в течение установленного срока годности практически не претерпевают изменений. Различия между показателями стандартных отклонений повторяемости для изученных показателей статистически недостоверны ( $p \leq 0,05$ ).

Основопологающим фактором для живой вакцины является количество жизнеспособных клеток в лиофилизированном препарате, по которому, в соответствии с требованиями НД, определяется число доз в ампуле.

В процессе хранения показатель жизнеспособности препарата может снижаться, особенно в течение первых трех месяцев. Учитывая это, проведен сравнительный анализ жизнеспособности всех экспериментальных серий вакцины в определенные временные промежутки (рисунок).

Непосредственно после изготовления вакцины

Мониторинг показателей качества вакцины чумной живой в течение срока годности  
Monitoring of indicators of live plague vaccine quality over the shelf life

Показатели качества препарата Preparation quality indicators	Требования ПР Master formula requirements	На дату выпуска At the date of production	2016	2017	2018
Концентрация микробных клеток, м.к./мл Microbe cell content, mc/ml	50·10 <sup>9</sup> – 100·10 <sup>9</sup>	74,1±4,1	74,1±4,1	73,8±3,6	73,6±3,7
Жизнеспособность, % Viability, %	≥ 25	39,0±5,3	38,6±4,1	37,4±5,2	33,2±3,6
Термостабильность, сут Thermostability, day	≥ 4	10,9±2,0	10,5±3,1	10,1±2,4	9,0±3,6
Потеря в массе при высушивании, % Mass loss during drying, %	≤ 4,0	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1
ЕД <sub>50</sub> для белых мышей, ж.м.к. Immunogenic Dose (ID) <sub>50</sub> for white mice, live microbe cells	≤ 4·10 <sup>4</sup>	13420	-	10647	-
ЕД <sub>50</sub> для морских свинок, ж.м.к. ID <sub>50</sub> for guinea pigs, live microbe cells	≤ 1·10 <sup>4</sup>	8237	-	5593	-

жизнеспособность составляла (39,0±5,3) %. К концу срока хранения данный показатель снижался и в итоге составил (33,2±3,6) %. При этом следует отметить, что такое снижение закономерно для «живого препарата» и не является критическим в полученных пределах. Вместе с тем ни в одной серии уменьшения жизнеспособности ниже регламентированного уровня (25 %) не произошло.

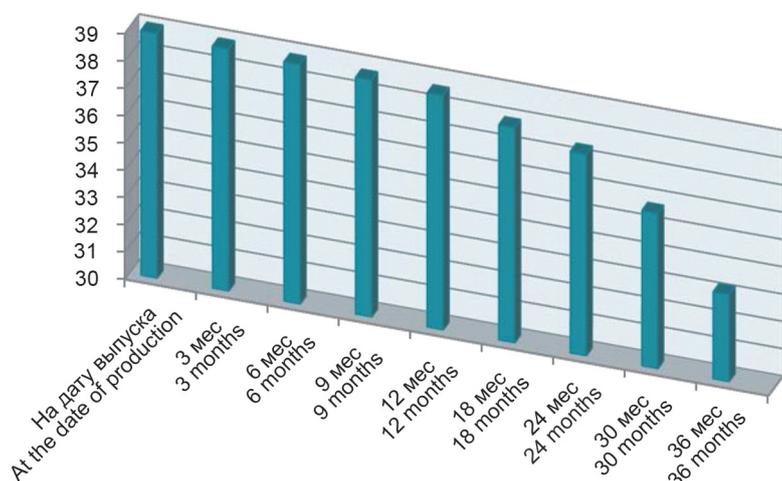
Проведенные исследования показывают, что препарат вакцины чумной живой, полученной на среде из гидролизата кукурузного экстракта сгущенного, сохраняет стабильность регламентированных показателей в течение всего срока годности, что еще раз подтверждает целесообразность использования данной питательной среды в промышленном производстве препарата.

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

**Список литературы**

1. Verma S.K., Tuteja U. Plague vaccine development: current research and future trends. *Front. Immunol.* 2016; 7:602. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00602.  
2. Бывалов А.А., Кутырев В.В. Современное состояние проблемы совершенствования средств вакцинопрофилактики чумы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2011; 2:97–104.

3. Williamson E.D., Oyston P.C. Protecting against plague: towards a next-generation vaccine. *Clin. Exp. Immunol.* 2013; 172(1): 1–8. DOI: 10.1111/cei.12044.  
4. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. «Элби-СПб»; 2008. 352 с.  
5. Михайлова В.С., Поляк М.С., Суханова С.М. О роли внутрилабораторного контроля качества в стандартизации питательных сред для микробиологических исследований в клинико-диагностических лабораториях. *Проблемы стандартизации в здравоохранении.* 2009; 5–6:8–15.  
6. Башкирова С.Н., Погребняк А.В., Степанова Э.Ф. Теоретическая оценка взаимного влияния компонентов на общую стабильность препарата. *Вестник новых медицинских технологий.* 2006; 13(1):102–4.  
7. Jadhav S.S., Dogar V., Gautam M., Gairola S. Stability testing of vaccines: Developing Countries Vaccine Manufacturers' Network (DCVMN) perspective. *Biologicals.* 2009; 37(6):360–3. DOI: 10.1016/j.biologicals.2009.08.003.  
8. Pfeleiderer M. Stability of vaccines – bridging from stability data to continuous safety and efficacy throughout shelf life – An always reliable approach? *Biologicals.* 2009; 37(6):364–8. DOI: 10.1016/j.biologicals.2009.08.013.  
9. Касина И.В., Алексеева С.А., Фадейкина О.В., Немировская Т.И., Волкова Р.А. Аттестация новой серии отраслевого стандартного образца для контроля специфической активности и термостабильности вакцины чумной живой. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2018; 18(4):262–7. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-4-262-267.  
10. Давыдов Д.С. Анализ стабильности показателей качества биологических лекарственных препаратов при проведении испытаний в рамках подтверждения соответствия. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2017; 17(4):230–2.  
11. Сакаева И.В., Бунятян Н.Д., Ковалева Е.Л., Саканян Е.И., Митькина Л.И., Прокопов И.А., Шелехина Е.С., Митькина Ю.В. Основные подходы к изучению стабильности лекарственных препаратов.



Анализ жизнеспособности вакцины чумной живой на протяжении срока годности

Analysis of viability of live plague vaccine over the shelf life

ных средств: отечественный и международный опыт. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013; 3:8–11.

12. Колышкин В.М., Васильев А.В. Оценка стабильности производства коревой вакцины. *Биотехнология*. 2008; 1:57–63.

13. Николаева Л.Л., Гулякин И.Д., Орлова О.Л., Полозкова А.П., Оборотова Н.А., Санарова Е.В., Ланцова А.В., Хламов В.В., Бунятян Н.Д. Лиофилизация как способ стабилизации лекарственных препаратов (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2017; 51(4):54–9. DOI: 10.30906/0023-1134-2017-51-4-54-58.

14. Комиссаров А.В., Бибииков Д.Н., Волох О.А., Бадарин С.А., Сеницына Н.В., Костылева Н.И., Германчук В.Г., Никифоров А.К. Лиофилизация живых вакцин. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2018; 14(3):56–73.

15. Файбич М.М. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения. *Успехи микробиологии*. 1983; 18:193–215.

16. Бекер М.Е., Дамберг Б.Э., Рапопорт А.И. Анабиоз микроорганизмов. Рига: «Зинатне»; 1981. 252 с.

17. Островский Д.Н., Капельяц А.С., Лукоянова М.А. Прикладные аспекты биохимии мембран. *Прикладная биохимия и микробиология*. 1983; 19(1):60–70.

18. Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Ростовцева Д.В., Катунина Л.С., Зуенко А.А. Оценка качества вакцины чумной живой с использованием питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 3:46–49. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-46-49.

19. Государственная Фармакопея Российской Федерации, XIV издание. Москва; 2018. Т. 1.

## References

1. Verma S.K., Tuteja U. Plague vaccine development: current research and future trends. *Front. Immunol.* 2016; 7:602. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00602.

2. Byvalov A.A., Kutyrev V.V. [Current state of the problem of improving the means of vaccine prophylaxis of plague]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2011; (2):97–104.

3. Williamson E.D., Oyston P.C. Protecting against plague: towards a next-generation vaccine. *Clin. Exp. Immunol.* 2013; 172(1):1–8. DOI: 10.1111/cei.12044.

4. Polyak M.S., Sukharevich V.I., Sukharevich M.E. [Nutrient media for medical and sanitary microbiology]. “Elbi-SPb”; 2008. 352 p.

5. Mikhailova V.S., Polyak M.S., Sukhanova S.M. [On the role of intralaboratory quality control in the standardization of nutrient media for microbiological research in clinical diagnostic laboratories]. *Problemy Standartizatsii v Zdravookhraneni [Problems of Standardization in Healthcare]*. 2009; 5(6):8–15.

6. Bashkirova S.N., Pogrebnyak A.V., Stepanova E.F. [Theoretical assessment of the mutual influence of the components on the overall stability of the drug]. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologiy [Bulletin of New Medical Technologies]*. 2006; 13(1):102–4.

7. Jadhav S.S., Dogar V., Gautam M., Gairola S. Stability testing of vaccines: Developing Countries Vaccine Manufacturers' Network (DCVMN) perspective. *Biologicals*. 2009; 37(6):360–3. DOI: 10.1016/j.biologicals.2009.08.003.

8. Pfeleiderer M. Stability of vaccines – bridging from stability data to continuous safety and efficacy throughout shelf life – An always reliable approach? *Biologicals*. 2009; 37(6):364–8. DOI: 10.1016/j.biologicals.2009.08.013.

9. Kasina I.V., Alekseeva S.A., Fadeykina O.V., Nemirovskaya T.I., Volkova R.A. [Certification of a new series of industry standard sample to control the specific activity and thermostability of the plague live vaccine]. *BIOpreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]*. 2018; 18(4):262–7. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-4-262-267.

10. Davydov D.S. [Analysis of stability indicators of biological drug quality during the tests in the framework of conformity assessment]. *BIOpreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]*. 2017; 17(4):230–2.

11. Sakaeva I.V., Bunyatyan N.D., Kovaleva E.L., Sakanyan E.I., Mit'kina L.I., Prokopov I.A., Shelekhina E.S., Mit'kina Yu.V. [The main approaches to the study of drug stability: domestic and international experience]. *Vedomosti Nauchnogo Tsentra Ekspertizy Sredstv Meditsinskogo Primeneniya [The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products]* 2013; (3):8–11.

12. Kolyskin V.M., Vasil'ev A.V. [Assessment of the stability of measles vaccine production]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2008; (1):57–63.

13. Nikolaeva L.L., Gulyakin I.D., Orlova O.L., Polozkova A.P., Oborotova N.A., Sanarova E.V., Lantsova A.V., Khlamov V.V., Bunyatyan N.D. [Lyophilization as a way to stabilize drugs (review)]. *Khimiko-Farmatsevtichesky Zhurnal [Chemical Pharmaceutical Journal]*. 2017; (4):54–9. DOI: 10.30906/0023-1134-2017-51-4-54-58.

14. Komissarov A.V., Bibikov D.N., Volokh O.A., Badarin S.A., Sinitsyna N.V., Kostyleva N.I., Germanchuk V.G., Nikiforov A.K. [Lyophilization of live vaccines]. *Vestnik Biotechnologii i Fiziko-Khimicheskoi Biologii im. Yu.A. Ovchinnikova [Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical-Chemical Biology]*. 2018; 14(3):56–73.

15. Faibich M.M. [Stabilization of vaccines in the process of drying and storage]. *Uspexhi Mikrobiologii [Advances in Microbiology]*. 1983; (18):193–215.

16. Beker M.E., Damberg B.E., Rapoport A.I. [Anabiosis of microorganisms]. Рига: «Зинатне»; 1981. 246 p.

17. Ostrovsky D.N., Kapel'yants A.S., Lukoyanova M.A. [Applied aspects of the biochemistry of membranes]. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologia [Applied Biochemistry and Microbiology]*. 1983; 19(1):60–70.

18. Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Rostovtseva D.V., Katunina L.S., Zuenko A. A. [Quality assessment of the live plague vaccine prepared using nutrient medium on the basis of the hydrolysate of concentrated corn steep]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (3): 46–9.

19. [The State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition]. Moscow; 2018. Vol. 1.

## Authors:

Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Katunina L.S., Rostovtseva D.V., Kostrominov A.V. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

## Об авторах:

Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Катунина Л.С., Ростовцева Д.В., Костроминов А.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Поступила 27.08.19.

Отправлена на доработку 26.09.19.

Принята к публ. 14.11.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-41-47

УДК 616.98:579.852.11

З.Ф. Дугаржапова, М.В. Чеснокова, Т.А. Иванова, С.А. Косилко, С.В. Балахонов

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ОБСЛЕДОВАНИЮ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ ЗАХОРОНЕНИЙ И СКОТОМОГИЛЬНИКОВ***ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация*

**Цель** работы – разработка единого межведомственного подхода к проведению комплексного эпидемиологического и эпизоотологического обследования сибиреязвенных захоронений (скотомогильников) с соблюдением нормативных требований административного, ветеринарного и санитарно-эпидемиологического законодательства для решения вопросов экспертной оценки биологической опасности объектов, санитарно-защитного зонирования и рационального землепользования. **Материалы и методы.** Проведен анализ нормативно-методической документации и источников литературы: использованы справочники, учетные и отчетные документы, информационные материалы и сведения учреждений ветеринарии, Роспотребнадзора, Россельхознадзора, муниципальных образований и других учреждений. Обобщены данные по комплексному эпизоотологическому и эпидемиологическому обследованию 27 сибиреязвенных захоронений (скотомогильников) в пяти субъектах Сибири и Дальнего Востока за 2013–2017 гг. **Результаты и обсуждение.** Впервые унифицирован алгоритм и разработана методика комплексного эпидемиологического и эпизоотологического обследования сибиреязвенных захоронений (скотомогильников) с известным местоположением, согласно требованиям ветеринарных и санитарно-эпидемиологических правил в помощь специалистам учреждений Роспотребнадзора и ветеринарии. Внедрение комплексного эпизоотолого-эпидемиологического обследования таких объектов с учетом ретроспективного и оперативного эпизоотолого-эпидемиологического анализа ситуации по сибирской язве на административной территории, изучения санитарно-ветеринарного состояния объекта в совокупности с результатами лабораторных исследований проб на сибирскую язву позволит провести оценку биологической опасности сибиреязвенных захоронений (скотомогильников), решить вопросы их консервации и/или утилизации с последующим сокращением размеров санитарно-защитной зоны объекта и рациональным землепользованием. Разработаны и одобрены Ученым советом института методические рекомендации.

**Ключевые слова:** сибирская язва, комплексное эпидемиологическое и эпизоотологическое обследование, сибиреязвенное захоронение, скотомогильник.

*Корреспондирующий автор:* Дугаржапова Зоригма Федоровна, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

*Для цитирования:* Дугаржапова З.Ф., Чеснокова М.В., Иванова Т.А., Косилко С.А., Балахонов С.В. Совершенствование методических подходов к обследованию сибиреязвенных захоронений и скотомогильников. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 4:41–47. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-41-47

Z.F. Dugarzhapova, M.V. Chesnokova, T.A. Ivanova, S.A. Kosilko, S.V. Balakhonov

**Improvement of Methodical Approaches to Investigation of Anthrax Burials and Animal Burial Sites***Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation*

**Abstract. Objective** – development of the unified interdepartmental approach to realization of complex epidemiological and epizootiological inspection of anthrax burials and animal refuses (AB/AR) with law compliance of standard requirements of the administrative, veterinary and sanitary-and-epidemiological legislation for solving the problems of expert estimation of object's biological hazard, sanitary-protective zoning and rational land tenure. **Materials and methods.** Standard-methodical documentation and literature sources were analyzed, the official data, reference books, inventory registration and statement documents, information materials and the data of Veterinary Institutions, Rospotrebnadzor, Rosselkhozadzor, municipal formations and other establishments were used. The data of complex epizootiological and epidemiological investigation of 27 AB/AR in five entities of Siberia and Far East over 2013–2017 were summarized. **Results and discussion.** For the first time the algorithm was unified and the technique of complex epidemiological and epizootiological inspections of anthrax burials (refuses) with known location was developed according to the requirements of veterinary and sanitary-and-epidemiologic rules to aid the specialists of the Rospotrebnadzor and Veterinary Science Institutions. Introduction of complex epizootiological-and-epidemiological inspection of anthrax burials (refuses) taking into account the retrospective and operative epizootiological-and-epidemiological analysis of the situation on anthrax in the Siberian administrative territory, studying of sanitary-veterinary condition of an object in aggregate with the results of laboratory examinations of samples for anthrax will permit to estimate the biological danger of anthrax burials (refuses), to solve problems of its preservation and/or utilization with the subsequent reduction of the areas of sanitary-protective zone of the object and rational land tenure.

**Key words:** anthrax, complex epidemiological and epizootiological inspection, an anthrax burial, animal refuse.

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

**Corresponding author:** Zorigma F. Dugarzhapova, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

**Citation:** Dugarzhapova Z.F., Chesnokova M.V., Ivanova T.A., Kosilko S.A., Balakhonov S.V. Improvement of Methodical Approaches to Investigation of Anthrax Burials and Animal Burial Sites. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2019; 4:41–47. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-41-47

*Received 30.04.19. Accepted 14.05.19.*

В Российской Федерации (РФ) с конца XIX в. и по настоящее время сибирская язва среди сельскохозяйственных животных (СХЖ) официально зарегистрирована более чем в 35 тыс. стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктах (СНП), на территории которых учтены около 8 тыс. сибиреязвенных захоронений и скотомогильников (СЯЗ/ССМ) [1–5].

В XVIII–XIX вв. в России во время эпизоотий сибирской язвы трупы СХЖ оставляли на месте падежа, что приводило к возникновению стихийных захоронений [3]. В начале XIX в. павших животных закапывали в ямы глубиной не менее 2 м с насыпью земли в 0,5 м, при этом слой почвы, на которой лежал труп, сбрасывали в яму вместе с ним. В 1940 г. Правилами Наркомзема СССР регламентировано зарывание сибиреязвенных трупов СХЖ в ямы с хлорной известью или скотомогильники (СМ) из древесного материала («чешская яма»), либо их сжигание на специально оборудованных утилизационных заводах. С 1951 г. для утилизации биологических отходов начали использовать биотермические ямы Беккари [6]. В 1995 г. в РФ обновлены требования к выбору земельного участка, размещению, строительству и благоустройству СМ (ВСП № 13-7-2/469). Действующими ветеринарными правилами регламентировано уничтожение трупов павших от сибирской язвы животных методом сжигания. В 2007 г. внесены изменения в п. 6.1. ВСП № 13-7-2/469, исключена формулировка «остальные – являются объектами муниципальной собственности», что привело к появлению бесхозных неконтролируемых или заброшенных СМ.

Поскольку возбудитель сибирской язвы в споровой форме способен выживать при неблагоприятных условиях окружающей среды, он длительно сохраняется в останках животных, павших от сибирской язвы [3, 6–13]. Следовательно, места захоронений трупов животных оказываются резервуарами сибиреязвенной инфекции, и их биологическая опасность заключается в потенциальном отрицательном воздействии на различные сферы жизнедеятельности [14–16].

В последние десятилетия значительно возросла необходимость оценки опасности резервуаров сибиреязвенной инфекции [14, 16]. Следует отметить, что сведения о многих местах захоронений павших от сибирской язвы животных утеряны, обычно такие объекты обнаруживаются в период проведения землеустроительных работ. На территории пяти субъектов Приволжского и Центрального федеральных округов, где отмечается наибольшая плотность СНП, на основании разработанного алгоритма оценки эпизоотолого-эпидемиологической опасности 33 СЯЗ даны рекомендации о возможности сокращения санитарно-защитных зон (СЗЗ) скотомогильников [17–19]. Несмотря на существующую нормативно-законодательную базу, регламентирующую уничтожение и захоронение биологических отходов, к на-

стоящему времени нет унифицированного алгоритма обследования объектов для выявления комплекса факторов риска, обеспечивающих достоверную оценку биологической опасности СЯЗ/ССМ.

**Цель** работы – разработка единого межведомственного унифицированного подхода к проведению комплексного эпизоотологического и эпизоотологического обследования сибиреязвенных захоронений (скотомогильников) с соблюдением нормативных требований административного, ветеринарного и санитарно-эпидемиологического законодательства для решения вопросов экспертной оценки биологической опасности объектов, санитарно-защитного зонирования и рационального землепользования.

### Материалы и методы

Проведен анализ нормативно-методической документации и источников литературы по мерам уничтожения трупов СХЖ, павших от сибирской язвы. Использованы сведения официальных данных, справочников, перечней, списков, карт, атласов и кадастров СНП субъектов, учетных и отчетных документов, информационных материалов, а также сведения учреждений ветеринарии, Роспотребнадзора, Россельхознадзора, муниципальных образований и других учреждений в субъектах Сибири и Дальнего Востока.

Обобщены данные по комплексному эпизоотологическому и эпизоотологическому обследованию 27 ССМ/СЯЗ, проведенному в период 2013–2017 гг. на территории пяти субъектов: 13 объектов в шести районах Красноярского края, 11 в семи районах Приморского края и по одному в Республике Саха (Якутия), Новосибирской и Сахалинской областях. Всего отобрано 724 пробы, в том числе 694 пробы почвы и 30 проб костей и костных фрагментов СХЖ. Выполнено 1569 лабораторных исследований на сибирскую язву, культура *Bacillus anthracis* выделена из одной пробы почвы, специфическая ДНК обнаружена в трех пробах почвы и двух пробах костных фрагментов СХЖ. Нами разработаны методические рекомендации «Комплексное эпизоотолого-эпидемиологическое обследование сибиреязвенных захоронений (скотомогильников)», одобренные Ученым советом института, протокол № 1 от 29.05.2018 г.

### Результаты и обсуждение

В настоящее время все известные скотомогильники, в том числе сибиреязвенные, учтены в официальном перечне Департамента ветеринарии Министерства сельского хозяйства РФ (2012 г.), в котором указаны их административно-территориальное местонахождение, площадь, время захоронения, действующий или законсервированный объект, хозяйственное ведение, балансодержатель с указанием частной или муниципальной собственности и назва-

ние организации [4]. Проведение агрономических, строительных и других работ, связанных с выемкой и перемещением грунта, на угрожаемых территориях, в СНП (п. 4.2 ВП 13.3.1320-96) и сибирезязвенных захоронениях (п. 7.3 СП 3.1.7.2629-10) обязательно согласовывают с территориальными учреждениями ветеринарии и Роспотребнадзора субъектов РФ. Скотомогильники с захоронением в ямах, как санитарно-технические сооружения I класса опасности, предусматривают размеры СЗЗ 1000 м, скотомогильники с биологическими камерами (II класс опасности) – 500 м (п. 7.1.12 СанПиН 2.2.1/2.1.1.1200-03). В СЗЗ почвенных очагов сибирской язвы не разрешается отвод земельных участков для проведения изыскательских, гидромелиоративных, строительных и других работ, связанных с выемкой и перемещением грунта, последующим затоплением, подтоплением или изменением уровня грунтовых вод, а также передача в аренду, продажа в личную собственность, выделение под сады, огороды или иное землепользование участков территории в непосредственной близости к почвенным очагам сибирской язвы (п. 4.2 ВП 13.3.1320-96).

Территориальные органы и учреждения ветеринарии (п. 4.1 ВП 13.3.1320-96) и Роспотребнадзора (п. 7.2 СП 3.1.7.2629-10) в субъектах РФ ведут учет и контролируют санитарное состояние СЯЗ/ССМ не менее одного раза в год. Для органов исполнительной власти субъектов РФ в области ветеринарии и их подведомственных учреждений создана система оперативной отчетности «Ассоль. Экспресс», где указана информация о количестве, форме собственности и ветеринарно-санитарном состоянии сибирезязвенных скотомогильников. Учреждения Роспотребнадзора и ветеринарии в настоящее время формируют единую электронную базу данных по СЯЗ/ССМ в субъектах страны.

В настоящее время возникла необходимость определения и разграничения терминов «скотомогильник» и «захоронение». Сибирезязвенное захоронение (СЯЗ) – место захоронения трупов павших от сибирской язвы животных в земляных ямах глубиной не более 2 м. Сибирезязвенный скотомогильник (ССМ) – инженерный объект, отведенный под утилизацию и захоронение биологических отходов сельскохозяйственных животных, павших от сибирской язвы. Соответственно, такие объекты с точным местоположением, кроме документальных и архивных сведений, имеют характерные внешние (изменение рельефа местности и характера растительности, наличие контуров стен, признаков консервации, наличие аншлагов, ограждение и защитное оканавливание) и внутренние (неравномерность почвенных слоев, наличие костей и костных фрагментов СХЖ) признаки.

Унифицированный алгоритм комплексного эпизоотолого-эпидемиологического обследования СЯЗ/ССМ включает три этапа: сбор сведений об эпизоотических и эпидемических проявлениях си-

бирской язвы на административной территории, состоянии СЯЗ/ССМ и общих информационных данных; проведение полевых работ по обследованию состояния СЯЗ/ССМ с отбором проб объектов окружающей среды и лабораторные исследования проб на сибирскую язву; анализ ситуации по сибирской язве на административной территории, оценка ветеринарно-санитарного состояния СЯЗ/ССМ и результатов лабораторных исследований.

Балансодержатель земельного участка при планировании земельных работ на территории санитарно-защитных зон СЯЗ/ССМ, почвенных очагов сибирской язвы и СНП обязан организовать полевые работы с обследованием санитарно-ветеринарного состояния СЯЗ/ССМ и отбором проб объектов окружающей среды участка. Обследование и оценку санитарно-ветеринарного состояния участка проводят специалисты учреждений ветеринарии и Роспотребнадзора, а также специалисты Россельхознадзора и муниципальных образований в присутствии балансодержателя.

**I этап. Сбор сведений об эпизоотических и эпидемических проявлениях сибирской язвы на административной территории, состоянии СЯЗ/ССМ и общих информационных данных.** При сборе информации используют материалы Кадастра СНП РФ (2005 г.) [2]; Справочника населенных пунктов РСФСР, неблагополучных по сибирской язве (1975 г.) [1]; Перечня скотомогильников (в том числе сибирезязвенных), расположенных на территории Российской Федерации по федеральным округам (2012 г.) [2]; учетных и отчетных данных, журналов регистрации неблагополучного по сибирской язве пункта, эпизоотических журналов, ветеринарно-санитарного паспорта на скотомогильник (биотермическую яму) органов и учреждений ветеринарии; перечни, списки, карты, атласы и кадастры СНП субъекта РФ (при наличии); официальные материалы муниципальных образований, учреждений Роспотребнадзора и др., архивные материалы, литературные источники, а также результаты опроса старожилов. Необходимо установить количество учтенных СНП и СЯЗ/ССМ на административной территории, активность и кратность эпизоотических проявлений сибирской язвы, количество учтенных заболевших сибирской язвой СХЖ, диких животных и людей. Кроме сведений, имеющихся в ветеринарно-санитарной карточке СЯЗ/ССМ (местонахождение, расстояние до определенных объектов, площадь и ограждение, санитарная характеристика) требуются данные о количестве и видах павших и захороненных животных, типе СЯЗ/ССМ, методах уничтожения и утилизации биологических отходов.

Для полноты оценки ситуации необходимо провести сбор и анализ дополнительной информации: численность поголовья скота, количество и охват специфической иммунизацией против сибирской язвы; особенности географического положения объекта; природно-климатические условия админи-

стративной территории (за период с момента официальной регистрации сибирской язвы на административной территории); данные о ведении сельского хозяйства и животноводства; тип, характеристика (физический и химический состав) и описание разреза почвы земельного участка по почвенным картам, сведениям отделов имущественных и земельных отношений администраций муниципальных образований и материалам натуральных исследований; гидрогеологические условия (глубина промерзания и оттаивания грунта, уровень стояния грунтовых вод на местности); топографический план местности; картографические материалы (географическая, ведомственная, электронная, кадастровая или специализированная карты); космоснимки и аэрофотосъемка местности, результаты георадарного зондирования земельного участка (при их наличии). Необходимо учитывать архивные и современные данные по расположению водоохраных, заповедных и лесопарковых зон, населенных пунктов, животноводческих объектов, дорог и скотопроектных трасс.

**II этап. Проведение полевых работ по обследованию состояния СЯЗ/ССМ с отбором проб объектов окружающей среды и лабораторные исследования проб на сибирскую язву.** Полевые работы с осмотром местности и фото/видео документированием удобно проводить при низком травостое, отсутствии снежного покрова в поздний весенний, осенний и ранний летний периоды.

На достоверное наличие СЯЗ/ССМ при натурном осмотре указывает ряд признаков. В лесистой местности заметно, что деревья вокруг захоронения и/или в предполагаемом месте сибиреязвенного захоронения намного моложе, чем в общем массиве. При известной дате захоронения по возможности рассчитывают возраст деревьев и сопоставляют его с возрастом окружающих деревьев либо используют данные лесоустройства. На месте захоронения обращают внимание на изменение рельефа местности. На относительно свежее захоронение СХЖ указывает возвышение краев насыпи над уровнем окружающего грунта. Над старым захоронением видна впадина правильной геометрически округлой формы, так как после разложения трупов павших животных происходит оседание земли. Наличие контура деревянных или бетонированных стен различных размеров прямоугольной или круглой формы толщиной 200–300 мм с настилом и навесом является признаком скотомогильника в виде инженерных сооружений, таких как «чешская яма» или биотермическая яма Беккари. Признаками консервации СЯЗ/ССМ является наличие бетонированной крышки и/или площадки. Насыпной курган может свидетельствовать о сооружении защитного саркофага над бетонированной площадкой.

Размеры и площадь СЯЗ/ССМ обычно указаны в ветеринарно-санитарной карточке на биотермическую яму (скотомогильник). В полевых условиях размеры объекта, его площадь и сложившиеся пара-

метры СЗЗ определяют измерительными приборами (рулетка, дальномер лазерный, GPS-навигатор). Состояние СЯЗ/ССМ с уточненным местоположением и соблюдение размеров их СЗЗ оценивается в соответствии с нормативными требованиями действующих санитарных и ветеринарных правил (п. 6 ВСП № 13-7-2/469, п. 4.1 ВП 13.3.41100-96, п. 7.1. СП 3.1.7.2629-10). Необходимо проверить наличие аншлагов, предупредительных знаков с надписью «Сибирская язва!»; глухого ограждения высотой не менее 2 м с въездными воротами; наружного и внутреннего защитного оканавливания по периметру; навеса над биотермической ямой и подсобного помещения. Измерение настоящего и моделирование проектируемого размеров СЗЗ удобно провести на электронной карте, космо- и аэрофотоснимке, межземном плане и других картографических источниках. При этом учитывают количество объектов, попавших в эту зону, расстояние до дорог, водоемов, жилых и общественных зданий, пастбищ и животноводческих комплексов.

Установить точное местоположение СЯЗ/ССМ возможно на основании наличия внешних и внутренних признаков захоронения. К внешним признакам относят изменения рельефа местности, наличие навеса и контуры стен скотомогильника, к внутренним – неравномерность почвенных слоев и наличие костных фрагментов трупов животных. При равномерном распределении почвенных слоев и отсутствии костных фрагментов трупов животных можно утверждать, что вероятность захоронения в исследуемой точке отбора проб отсутствует. Наличие или отсутствие признаков захоронения в нескольких близлежащих точках подтверждает или опровергает точное местоположение объекта. Местоположение объекта на местности необходимо зафиксировать приборами GPS-навигации и отметить точку на карте. Определить расположение объекта возможно на архивных топографических, электронных (Google Earth, Yandex и др.), российской публичной кадастровой, ведомственных специализированных и других географических картах, а также на аэрофотосъемке местности с помощью управляемых дистанционных беспилотных летательных аппаратов (дронов) [20–24]. Использование геолокационных исследований и/или георадарного зондирования позволяет определить структурное изменение слоев почвы и точное местоположения захоронения [25].

Отбор проб СЯЗ/ССМ проводится специалистами профильных учреждений Роспотребнадзора и ветеринарии, обученными правилам безопасности работы с микроорганизмами II–IV групп патогенности. Пробы почвы отбирают согласно требованиям п. 4.4.1.4 МУ 4.2.2413-08 с использованием инвентаря и оборудования в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13. Количество проб для СЯЗ/ССМ не регламентировано, соответственно, перед работой необходимо составить схему отбора проб в зависимости от площади объекта, с учетом рельефа мест-

ности и гидрологического заключения. В точке отбора снимают верхний слой почвы на 2–3 см и пробы берут на глубине до 2,5 м через каждые 25 см не менее 200 г почвогрунта в пробе. Выбор точек отбора и количество проб зависят от площади захоронения. Точечный отбор проб обычно проводят в центре единичного захоронения или ССМ типа биотермической и «чешской» ям. Для отбора проб «конвертом» в квадрате со стороной не более 4 м намечают пять точек по диагонали (четыре точки по краям и одна посередине). Секторальное деление применяется на большой площади при неизвестном точном местоположении захоронения, при этом в каждом секторе намечают центр и пробы берут «конвертом».

Для отбора проб СЯЗ/ССМ (без признаков консервации) рекомендуют использовать гидравлические навесные ямобуры различного диаметра бурильно-крановых машин или универсальных буровых машин на автомобильном шасси или на базе тракторов. Во время отбора проб обращают внимание на изменение почвенных слоев в шурфе и наличие костей и костных фрагментов трупов животных. При смене точек отбора проб шнек гидравлического навесного ямобура очищают от почвы над шурфом и обжигают пламенем паяльной лампы (газовой горелки). По завершении работ оборудование дополнительно обрабатывают рабочим раствором дезинфицирующего средства в спороцидной концентрации. После отбора проб отвалы почвы смешивают в соотношении 1:3 с сухим хлорсодержащим дезинфицирующим средством, увлажняют водой и сбрасывают в шурфы (п. 5.19 ВП 13.3.1320-96). В журнале отбора проб записывают координаты точки отбора по GPS-навигации (точность настраивают до секунд) с указанием высоты над уровнем моря.

Пробы костей и костных фрагментов животных отбирают из шурфа захоронения (скотомогильника) и/или с поверхности почвы в пергаментную бумагу или промаркированные тканевые мешки. Упакованные пробы закрывают или завязывают, помещают в металлический бикс для транспортировки. Транспортирование и хранение проб осуществляется в закрытом на замок и опечатанном металлическом биксе при температуре окружающей среды. Сотрудники учреждения, проводившие отбор материала, обеспечивают наличие сопроводительных документов и доставку материала в лабораторию согласно правилам перевозки спецгрузов различными видами транспорта и требованиям (п. 3.4 СП 1.2.036-95). Отбор материала в полевых условиях осуществляет персонал в противочумных костюмах II типа одноразового или многоразового пользования. По окончании работ средства индивидуальной защиты (СИЗ) снимают и собирают в пакет для сбора и утилизации отходов класса В. Пакет плотно завязывают и помещают в отдельный бикс, закрывают и опечатывают. Одноразовые СИЗ можно утилизировать сжиганием с соблюдением правил пожарной безопасности. При использовании много-

разовых СИЗ или отсутствии возможности сжечь одноразовые СИЗ пакеты с одеждой доставляют в лабораторию и замачивают в баке с дезинфицирующим раствором или автоклавируют. Обувь (сапоги резиновые) очищают от почвы, затем двукратно орошают и/или протирают рабочим раствором спороцидного дезинфицирующего средства, высушивают и складывают в одноразовый пакет для последующей транспортировки. На основании полевых работ составляют акты комиссионного обследования СЯЗ/ССМ и протоколы отбора проб.

Исследования проб объектов окружающей среды на сибирскую язву проводят в бактериологических лабораториях, лицензированных на осуществление деятельности, связанной с использованием возбудителей II–IV групп патогенности (опасности), а также в Центрах индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности противочумных учреждений. Лаборатория должна быть аккредитована на техническую компетентность в установленном порядке и иметь соответствующее санитарно-эпидемиологическое заключение в соответствии с требованиями п. 4.1. СП 1.2.1318-03.

Пробоподготовку и лабораторные исследования почвы на наличие сибиреязвенного микроба и его ДНК проводят в соответствии с МУК 4.2.2413-08 и МУ 1.3.2569-09. Нами разработаны методические рекомендации по правилам отбора, транспортирования, пробоподготовки костей и костных фрагментов животных для лабораторных исследований на наличие возбудителя сибирской язвы (Иркутск, 2017 г.). Изучение проб костей и костных фрагментов животных аналогичны почве.

**III этап. Анализ ситуации по сибирской язве на административной территории, оценка ветеринарно-санитарного состояния СЯЗ/ССМ и результатов лабораторных исследований.** Анализ ситуации по сибирской язве на административной территории проводится по данным ретроспективного и оперативного анализа эпизоотической и эпидемической ситуации по сибирской язве на административной территории; анализа архивных материалов и источников литературы по сибиреязвенному захоронению. Комплексное эпизоотолого-эпидемиологическое обследование СЯЗ/ССМ в соответствии с требованиями действующих санитарно-эпидемиологических и ветеринарных правил с учетом ретроспективного и оперативного эпизоотолого-эпидемиологического анализа ситуации по сибирской язве на административной территории, изучения санитарно-ветеринарного состояния объекта в совокупности с результатами лабораторных исследований проб на сибирскую язву позволит дать оценку биологической опасности СЯЗ/ССМ с известным местоположением.

Таким образом, впервые унифицирован алгоритм и разработана методика комплексного эпизоотологического и эпизоотологического обследо-

дования СЯЗ/ССМ с известным местоположением для использования специалистами учреждений Роспотребнадзора и ветеринарии. Внедрение данной методики обследования необходимо для оценки биологической опасности СЯЗ/ССМ по ряду критериев при решении вопросов консервации и/или утилизации таких объектов, изменения размеров санитарно-защитного зонирования и рационального землепользования.

Работа выполнена в рамках НИР 003-1-16 «Научно-практическое обоснование оценки биологической опасности сибирезвездных захоронений и скотомогильников» (2016–2018 гг.).

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

### Список литературы

- Кузьмин Г.Г., Таршиш М.Г., Черкасский Б.А. Справочник населенных пунктов РСФСР, неблагоприятных по сибирской язве. М.: М-во сельск. хоз-ва РСФСР; 1976. Ч. 3. 319 с.
- Черкасский Б.Л., редактор. Кадастр стационарно-неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации. Справочник. М.: Интерсэн; 2005. 829 с.
- Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язве. М.: Интерсэн; 2002. 384 с.
- Сургучева Л.М., Боровой В.Н., Яременко Н.А. Перечень скотомогильников (в том числе сибирезвездных), расположенных на территории Российской Федерации. М.: ФГБНУ «Росинформагротех»; 2012. 29 с.
- Симонова Е.Г., Картава С.А., Раичич С.Р., Локтионова М.Н., Шабейкин А.А. Сибирская язва в Российской Федерации: совершенствование эпизоотолого-эпидемиологического надзора на современном этапе. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(2):57–62. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-2-57-62.
- Пастухов Б.Н., редактор. Сибирская язва. Сборник организационно-методических материалов. М.: Медгиз; 1962. 148 с.
- Chen W., Lai S., Yang Y., Liu K., Li X., Yao H., Li Y., Zhou H., Wang L., Mu D., Yin W., Fang L., Yu H., Cao W. Mapping the Distribution of Anthrax in Mainland China, 2005–2013. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(4):e0004637. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004637.
- Michael H.N., Jason K.B. Linking Geospatial and Laboratory Sciences to Define Mechanisms behind Landscape Level Drivers of Anthrax Outbreaks. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019; 16(19):3747. DOI: 10.3390/ijerph16193747.
- Lequette Y., Garenaux E., Tauveron G., Dumez S., Perchat S., Slomianny C., Lereclus D., Guerardel Y., Faille C. Role played by exosporium glycoproteins in the surface properties of *Bacillus cereus* spores and in their adhesion to stainless steel. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(14):4905–11. DOI: 10.1128/AEM.02872-10.
- Carlson C.J., Getz W.M., Kausrud K.L., Cizauskas C.A., Blackburn J.K., Bustos Carrillo F.A., Colwell R., Easterday W.R., Ganz H.H., Kamath P.L., Økstad O.A., Turner W.C., Kolstø A.B., Stenseth N.C. Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (*Bacillus anthracis*). *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2018; 93(4):1813–31. DOI: 10.1111/brv.12420.
- Vieira A.R., Salzer J.S., Traxler R.M., Hendricks K.A., Kadzik M.E., Marston K.M., Kolton C.B., Stoddard R.A., Hoffmaster A.R., Bower W.A., Walke H.T. Enhancing Surveillance and Diagnostics in Anthrax-Endemic Countries. *Emerg. Infect Dis.* 2017; 23(13):S147–S1153. DOI: 10.3201/eid2313.170431.
- Anderson K., Gaston K.J. Lightweight unmanned aerial vehicles will revolutionize spatial ecology. *Frontiers in ecology and the environment*. 2013; 11(3):138–46. DOI: 10.1890/120150.
- Carlson C.J., Getz W.M., Kausrud K.L., Cizauskas C.A., Blackburn J.K., Bustos Carrillo F.A., Colwell R., Easterday W.R., Ganz H.H., Kamath P.L., Økstad O.A., Turner W.C., Kolstø A.B., Stenseth N.C. Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (*Bacillus anthracis*). *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2018; 93(4):1813–31. DOI: 10.1111/brv.12420.
- Маринин Л.И., Дятлов И.А., Шишкова Н.А., Герасимов В.Н. Сибирезвездные скотомогильники: проблемы и решения. М.: Династия; 2017. 215 с.
- Воротников И.Л., Колотырин К.П. Управление биологическими отходами на основе государственно-частного партнерства и экологического страхования. *Научное обозрение*.

2014; 4:355–9.

- Гаврилов В.А., Тихонов И.В., Девришов Д.А. Проблемы ликвидации сибирской язве в России. *Ветеринарная медицина*. 2011; 2:64–6.
- Симонова Е.Г., Шабейкин А.А., Раичич С.Р., Локтионова М.Н., Сабурова С.А., Пяташина М.А., Ладный В.И., Гулюкин А.М. Применение геоинформационных технологий для оценки эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по сибирской язве. *Анализ риска здоровью*. 2019; 3:74–82. DOI: 10.21668/health.risk/2019.3.09.
- Симонова Е.Г., Галкин В.В., Локтионова М.Н., Ладный В.И. Сибирезвездные скотомогильники на территории РФ и их биологическая безопасность. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010; 4:23–6.
- Картава С.А., Симонова Е.Г., Локтионова М.Н., Колганова О.А., Ладный В.И., Раичич С.Р. Научное обоснование размеров санитарно-защитных зон сибирезвездных захоронений на основе комплексной оценки риска. *Гигиена и санитария*. 2016; 95(7):601–6. DOI: 10.18821/0016-9900-2016-95-7-601-606.
- Бадмаев Н.Б. Геоинформационные технологии распознавания заброшенных скотомогильников. Улан-Удэ: изд-во БНЦ СО РАН; 2017. 164 с.
- Дугаржапова З.Ф., Бадмаев Н.Б., Такайшвили В.Е., Кравец Е.В., Цыдыпов Б.З., Очиров О.Н., Аюржанаев А.А., Содномов Б.В., Малагкина Б.Б., Зверева О.А., Шахаева О.П., Булутов К.В., Ханхареев С.С., Чеснокова М.В., Балахонов С.В. Экологическое и микробиологическое обследование неблагополучных по сибирской язве территорий Республики Бурятия. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 4:22–8.
- Maksimović Z., Cornwell M.S., Semren O., Rifatbegović M. The apparent role of climate change in a recent anthrax outbreak in cattle. *Rev. Sci. Tech.* 2017; 36(3):959–63. DOI: 10.20506/rst.36.3.2727.
- Blackburn J.K., Matarimov S., Kozhokeeva S., Tagaeva Z., Bell L.K., Krcalick I.T., Zhunushov A. Modeling the Ecological Niche of *Bacillus anthracis* to Map Anthrax Risk in Kyrgyzstan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2017; 96(3):550–6. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0758.
- Локтионова М.Н., Картава С.А., Смирнова Е.В., Симонова Е.Г., Оглезнева Е.Е. Сибирезвездные захоронения на территории Центрального федерального округа Российской Федерации. *Инфекция и иммунитет*. 2017; S:367.
- Дмитриев А.А. Применение георадиолокационных технологий при решении археологических задач. *Современные технологии. Системный анализ. Моделирование*. 2011; 2:52–6.

### References

- Kuz'min G.G., Tarshis M.G., Cherkassky B.A. [Directory of settlements of the RSFSR, potentially hazardous as regards anthrax]. Moscow; 1976. Pt. 3. 319 p.
- Cherkassky B.L., editor. [Cadastre of Stationary Potentially Hazardous as Regards Anthrax Areas in the Russian Federation. Reference Book]. Moscow: "Intersen"; 2005. 829 p.
- Cherkassky B.L., editor. [Epidemiology and Prophylaxis of Anthrax]. Moscow: "Intersen"; 2002. 384 p.
- Surgucheva L.M., Borovoy V.N., Yaremenko N.A. [List of animal burial grounds (including anthrax ones) located in the territory of the Russian Federation (Far Eastern Federal District)]. Moscow; 2012. 29 p.
- Simonova E.G., Kartavaya S.A., Raichich S.R., Loktionova M.N., Shabeikin A.A. [Anthrax in the Russian Federation: improvement of epizootiological-epidemiological surveillance at the modern stage]. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2018; 17(2):57–62. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-2-57-62.
- Pastukhov B.N., editor. [Anthrax (Collection of organizational and methodological materials)]. Moscow: "Medgiz"; 1962. 148 p.
- Chen W., Lai S., Yang Y., Liu K., Li X., Yao H., Li Y., Zhou H., Wang L., Mu D., Yin W., Fang L., Yu H., Cao W. Mapping the Distribution of Anthrax in Mainland China, 2005–2013. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(4):e0004637. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004637.
- Michael H.N., Jason K.B. Linking Geospatial and Laboratory Sciences to Define Mechanisms behind Landscape Level Drivers of Anthrax Outbreaks. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019; 16(19):3747. DOI: 10.3390/ijerph16193747.
- Lequette Y., Garenaux E., Tauveron G., Dumez S., Perchat S., Slomianny C., Lereclus D., Guerardel Y., Faille C. Role played by exosporium glycoproteins in the surface properties of *Bacillus cereus* spores and in their adhesion to stainless steel. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(14):4905–11. DOI: 10.1128/AEM.02872-10.
- Carlson C.J., Getz W.M., Kausrud K.L., Cizauskas C.A., Blackburn J.K., Bustos Carrillo F.A., Colwell R., Easterday W.R., Ganz H.H., Kamath P.L., Økstad O.A., Turner W.C., Kolstø A.B., Stenseth N.C. Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (*Bacillus anthracis*). *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2018; 93(4):1813–31. DOI: 10.1111/brv.12420.
- Маринин Л.И., Дятлов И.А., Шишкова Н.А., Герасимов В.Н. Сибирезвездные скотомогильники: проблемы и решения. М.: Династия; 2017. 215 с.
- Воротников И.Л., Колотырин К.П. Управление биологическими отходами на основе государственно-частного партнерства и экологического страхования. *Научное обозрение*.

- Stenseth N.C. Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (*Bacillus anthracis*). *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2018; 93(4):1813–31. DOI: 10.1111/brv.12420.
11. Vieira A.R., Salzer J.S., Traxler R.M., Hendricks K.A., Kadzik M.E., Marston K.M., Kolton C.B., Stoddard R.A., Hoffmaster A.R., Bower W.A., Walke H.T. Enhancing Surveillance and Diagnostics in Anthrax-Endemic Countries. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23(13):S147–S1153. DOI: 10.3201/eid2313.170431.
12. Anderson K., Gaston K.J. Lightweight unmanned aerial vehicles will revolutionize spatial ecology. *Frontiers in ecology and the environment.* 2013; 11(3):138–46. DOI: 10.1890/120150.
13. Carlson C.J., Getz W.M., Kausrud K.L., Cizauskas C.A., Blackburn J.K., Bustos Carrillo F.A., Colwell R., Easterday W.R., Ganz H.H., Kamath P.L., Økstad O.A., Turner W.C., Kolstø A.B., Stenseth N.C. Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (*Bacillus anthracis*). *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2018; 93(4):1813–31. DOI: 10.1111/brv.12420.
14. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Shishkova N.A., Gerasimov V.N. [Anthrax cattle burials: problems and solutions]. Moscow: “Dynastiya”; 2017. 216 p.
15. Vorotnikov I.L., Kolotyryn K.P. [Biological waste management based on public-private partnerships and environmental insurance]. *Nauchnoe Obozrenie [Scientific Review]*. 2014. 4:355–9.
16. Gavrilov V.A., Tikhonov I.V., Devrishov D.A. [Problems of anthrax elimination in Russia]. *Veterinarnaya Meditsina [Veterinary medicine]*. 2011; 2:64–6.
17. Simonova E.G., Shabeikin A.A., Raichich S.R., Loktionova M.N., Saburova S.A., Patyashina M.A., Ladny V.I., Gulyukin A.M. [Application of geo-information technologies for the assessment of epizootiological and epidemiological situation on anthrax]. *Analiz Riska Zdoroviyu [Health Risk Analysis]*. 2019; 3:74–82. DOI: 10.21668/health.risk/2019.3.09.
18. Simonova E.G., Galkin V.V., Loktionova M.N., Ladny V.I. [Anthrax cattle burial grounds in the territory of the Russian Federation and their biological safety]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2010; 4:23–6.
19. Kartavaya S.A., Simonova E.G., Loktionova M.N., Kolganova O.A., Ladny V.I., Raichich S.R. [Scientific substantiation of the size of sanitary protection zones of anthrax burials based on a comprehensive risk assessment]. *Gigiena i Sanitariya [Hygiene and sanitation]*. 2016; 95(7):601–6. DOI: 10.18821/0016-9900-2016-95-7-601-606.
20. Badmaev N.B. [Geo-information technologies for the recognition of abandoned cattle burial sites]. Ulan-Ude; 2017. 164 p.
21. Dugarzhapova Z.F., Badmaev N.B., Takayshvili V.E., Kravets E.V., Tsydyпов B.Z., Ochirov O.N., Ayurzhanaev A.A., Sodnomov B.V., Malatkina B.B., Zvereva O.A., Shakhaeva O.P., Bulutov K.V., Khankhareev S.S., Chesnokova M.V., Balakhonov S.V. [Ecological and microbiological examination of territories non-welfare for anthrax in the Republic of Buryatia]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2016; 4:22–8.
22. Maksimović Z., Cornwell M.S., Semren O., Rifatbegović M. The apparent role of climate change in a recent anthrax outbreak in cattle. *Rev. Sci. Tech.* 2017; 36(3):959–63. DOI: 10.20506/rst.36.3.2727.
23. Blackburn J.K., Matarimov S., Kozhokeeva S., Tagaeva Z., Bell L.K., Kracalik I.T., Zhunushov A. Modeling the Ecological Niche of *Bacillus anthracis* to Map Anthrax Risk in Kyrgyzstan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2017; 96(3):550–6. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0758.
24. Loktionova M.N., Kartavaya S.A., Smirnova E.V., Simonova E.G., Oglezneva E.E. [Anthrax burials in the territory of the Central Federal District of the Russian federation]. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2017; S:367.
25. Dmitriev A.A. [The use of geo-radar technologies in solving archaeological problems]. *Sovremennye Tekhnologii. Sistemnyy Analiz. Modelirovanie [Modern technologies. System analysis. Modeling]*. 2011; 2:52–6.

**Authors:**

Dugarzhapova Z.F., Chesnokova M.V., Ivanova T.A., Kosilko S.A., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

**Об авторах:**

Дугаржапова З.Ф., Чеснокова М.В., Иванова Т.А., Косилко С.А., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Поступила 30.04.19.

Принята к публ. 14.05.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-48-55

УДК 616.98:579.842.23

Г.А. Ерошенко<sup>1</sup>, Н.В. Попов<sup>1</sup>, Ж.В. Альхова<sup>1</sup>, Л.М. Куклева<sup>1</sup>, А.Н. Балыкова<sup>1</sup>, А.К. Гражданов<sup>1</sup>,  
Т.З. Аязбаев<sup>2</sup>, Н.С. Майканов<sup>3</sup>, В.В. Кутырев<sup>1</sup>

## РАСПРОСТРАНЕНИЕ *YERSINIA PESTIS* СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА В СЕВЕРНОМ, СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ ПРИКАСПИИ И ПРЕДКАВКАЗЬЕ ВО ВТОРОЙ ПОЛОВИНЕ XX ВЕКА

<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; <sup>2</sup>РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Алматы, Республика Казахстан; <sup>3</sup>РГУ «Уральская противочумная станция» Комитета охраны общественного здоровья Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Уральск, Республика Казахстан

**Цель работы** – установление происхождения штаммов *Y. pestis*, получивших распространение в природных очагах чумы Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья во второй половине XX века. **Материалы и методы.** Проведено исследование свойств и полногеномное секвенирование 22 штаммов *Y. pestis*, выделенных в 1923–2003 гг. в пяти природных очагах сусликового типа, расположенных в Северном и Северо-Западном Прикаспии и Предкавказье. Филогенетический анализ выполнен по данным полногеномного SNP анализа на основе 1348 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, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья относятся к филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биовара возбудителя чумы. По данным полногеномного SNP анализа выявлено наличие двух групп близкородственных штаммов, включающих штаммы 1923–1945 и 1962–2003 гг. Предшественниками штаммов 1962–2003 гг. из Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья на филогенетическом дереве являются штаммы из Северного Приаралья 1945 г. Это свидетельствует о том, что синхронная активизация группы природных очагов Прикаспийской низменности и Предкавказья в 1975–1979 гг., после длительных 20–37-летних перерывов, могла быть вызвана распространением штаммов из Северного Приаралья. Данные эпизоотических наблюдений указывают на то, что активизация Волго-Уральского песчаного очага чумы в 60-х годах прошлого столетия предшествовала началу регистрации эпизоотий чумы на территории природных очагов сусликового типа в Северном, Северо-Западном Прикаспии и в Предкавказье.

**Ключевые слова:** возбудитель чумы, природные очаги Прикаспия, штаммы, распространение.

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

Для цитирования: Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Альхова Ж.В., Куклева Л.М., Балыкова А.Н., Гражданов А.К., Аязбаев Т.З., Майканов Н.С., Кутырев В.В. Распространение *Yersinia pestis* средневекового биовара в Северном, Северо-Западном Прикаспии и Предкавказье во второй половине XX века. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 4:48–55. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-48-55

G.A. Eroshenko<sup>1</sup>, N.V. Popov<sup>1</sup>, Zh.V. Al'khova<sup>1</sup>, L.M. Kukleva<sup>1</sup>, A.N. Balykova<sup>1</sup>, A.K. Grazhdanov<sup>1</sup>,  
T.Z. Ayazbaev<sup>2</sup>, N.S. Maikanov<sup>3</sup>, V.V. Kutyrev<sup>1</sup>

## Dissemination of *Yersinia pestis* of Medieval Biovar in Northern, North-Western Caspian Sea Region and Fore-Caucasus in the Second Half of the Twentieth Century

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; <sup>2</sup>M. Aikimbaev National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections, Ministry of Healthcare of the Republic of Kazakhstan, Almaty, Republic of Kazakhstan; <sup>3</sup>Ural Plague Control Station of the Committee for Public Healthcare, Ministry of Healthcare of the Republic of Kazakhstan, Uralsk, Republic of Kazakhstan

**Abstract. Objective** of the study was to determine the origin of *Y. pestis* strains that widely disseminated in natural plague foci of Northern, North-Western Caspian Sea region and Fore-Caucasus in the second half of the XX century. **Materials and methods.** We have carried out the investigation of properties and whole genome sequencing of 22 *Y. pestis* strains, isolated between 1923 and 2003 in five natural foci of the souslik type, situated in Northern and North-Western Caspian Sea region and Fore-Caucasus. Phylogenetic analysis was conducted using the data of whole genome SNP-typing, based on 1348 identified SNPs. The search of SNPs in the core genome was performed with the help of Wombac 2.0 software. Phylogenetic relations were analyzed using Maximum Likelihood dendrogram, GTR model. **Results and discussion.** All the studied strains from the foci of Northern, North-Western Caspian Sea region and Fore-Caucasus fall into phylogenetic branch 2. MED1 of medieval biovar. On the basis of whole genome SNP-analysis, existence of two groups of closely related strains, comprising the strains dated 1923–1945 and 1962–2003, has been revealed. The predecessors of the 1962–2003 strains from the Northern, North-Western Caspian Sea region and Fore-Caucasus on the phylogenetic tree are the strains from Northern Aral Sea region that go back to 1945. It testifies to the fact that synchronized activation of a group of natural foci in Caspian Sea lowland and Fore-Caucasus in 1975–1979, after prolonged 20–37 year long breaks, could be caused by the dissemination of the strains from the Northern Aral Sea region. The data of epizootic observations indicate that activation of Volga-Ural sandy plague focus in 1960s preceded the start of registration of plague epizooties in the territory of natural foci of souslik type in Northern, North-Western Caspian sea region and Fore-Caucasus.

**Key words:** plague agent, natural foci of the Caspian Sea region, *Y.* strains, dissemination.

*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., Al'khova Zh.V., Kukleva L.M., Balykova A.N., Grazhdanov A.K., Ayazbaev T.Z., Maikanov N.S., Kutyrev V.V. Dissemination of *Yersinia pestis* of Medieval Biovar in Northern, North-Western Caspian Sea Region and Fore-Caucasus in the Second Half of the Twentieth Century. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:48–55 (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-48-55

*Received 29.10.19. Accepted 10.12.19.*

Группа природных очагов чумы сусликового типа расположена в регионах Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья. В нее входят Зауральский (Урало-Уильский) степной, Волго-Уральский степной, Прикаспийский Северо-Западный степной, Дагестанский равнинно-предгорный очаги. Они характеризуются одинаковой биоценотической структурой. Основным носителем чумы на этой территории является малый суслик *Spermophilus pygmaeus*, основными переносчиками – блохи *Neopsylla setosa* и *Citellophilus tesquorum*. В начале XX в. в этих очагах регистрировали интенсивные эпизоотии, сопровождавшиеся вспышками чумы среди населения, которые прекратились к середине столетия [1]. Последние эпизоотии чумы перед длительным периодом эпизоотического покоя (отсутствие находок зараженных животных и выделения культур *Yersinia pestis*) в границах степной и полупустынной ландшафтных зон России и Казахстана зарегистрированы в Зауральском степном (1942 г.), в Волго-Уральском степном (1950 г.), в Прикаспийском Северо-Западном степном (1954 г.), и в Дагестанском равнинно-предгорном (1956 г.) природных очагах [2]. Отсутствие эпизоотий чумы в середине XX в. на этих территориях считали результатом их полного оздоровления вследствие проведения беспрецедентных в мировой практике работ по истреблению малого суслика [3, 4]. Эффект противозооотических истребительных работ также усилен неблагоприятным воздействием на паразитарные системы природных очагов сусликового типа очередной волны потепления климата, которое сопровождалось значительным снижением увлажнения степных и полупустынных ландшафтов Северного и Северо-Западного Прикаспия [5–7]. Усиление аридизации климата в 50–60-х годах прошлого столетия неблагоприятно отразилось на генеративном потенциале популяций малого суслика и обусловило наступление длительной глубокой депрессии его численности. Последующее изменение климата на территории Прикаспийской низменности в 1976–1995 гг. сопровождалось, напротив, повышением увлажненности территорий европейского Юго-Востока России [8, 9]. Последнее во многом способствовало восстановлению эпизоотического потенциала расположенных здесь природных очагов чумы сусликового типа и создало предпосылки к развитию эпизоотий в поселениях фоновых видов грызунов. В 1975–1979 гг. эпизоотии чумы вновь зарегистрированы практически одновременно на обширных территориях Прикаспийской низменности и Предкавказья. В частности, в Дагестанском равнинно-предгорном очаге эпизоотии чумы выявлены в 1975 г., в Волго-Уральском степном (Урало-

Кушумское междуречье) и в Зауральском степном – в 1978 г., в Прикаспийском Северо-Западном степном – в 1979 г. При активизации Прикаспийского Северо-Западного степного очага в 1979 г. произошел один случай заражения чумой человека (населенный пункт Артезиан, Республика Калмыкия) [1].

Синхронная активизация природных очагов чумы сусликового типа Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья в 1975–1979 гг. совпала с резким подъемом уровня Каспийского моря, равно как и уровня грунтовых вод на территории Прикаспийской низменности, который продолжался вплоть до 1995 г. [10]. В период роста уровня Каспийского моря в 1978–1995 гг. отмечен высокий уровень эпизоотической активности этой группы равнинных природных очагов чумы сусликового типа. Далее, начиная с 1996 г., в связи с наступлением очередной волны потепления климата и падения уровня Каспийского моря, их эпизоотическая активность вновь одновременно снизилась [11, 12]. В XXI столетии в 2003–2019 гг. в Зауральском (Урало-Уильском) и Волго-Уральском степных очагах, а также в 2004–2019 гг. в Дагестанском равнинно-предгорном очаге находок зараженных животных не выявлено. Очевидно, что для выяснения причин длительного отсутствия эпизоотической активности природных очагов чумы необходимо учитывать данные по состоянию всех составляющих их паразитарных систем и в первую очередь свойства штаммов возбудителя чумы [13–18]. По данным микробиологических и молекулярно-генетических исследований установлено, что в очагах Прикаспия циркулирует *Y. pestis* средневекового биовара филогенетической ветви 2.MED1, который хорошо адаптирован к засушливым ландшафтно-географическим биоценозам [19]. Именно штаммы средневекового биовара ветви 2.MED1 были этиологическими агентами вспышек и отдельных случаев чумы в очагах Прикаспия в первой половине XX столетия. Однако филогенетическое родство и происхождение штаммов *Y. pestis*, получивших распространение на территории Прикаспийской низменности и в Предкавказье в 1975–1979 гг. после длительного периода покоя очагов в середине прошлого столетия, ранее не исследованы.

Применение современных молекулярно-генетических технологий и полногеномного секвенирования штаммов *Y. pestis*, выделенных в разные периоды, позволяет провести пространственно-временной анализ циркуляции и распространения возбудителя чумы на очаговых территориях. Так, на основе филогенетического анализа штаммов *Y. pestis* показано, что активизация Волго-Уральского песчаного природного очага в 1962–1977 гг. могла быть связана с распространением в этом очаге штаммов средневе-

кового биовара ветви 2.MED1, ведущих свое происхождение из Северо-Приаральского пустынного очага в Казахстане [20]. По данным эпизоотологических наблюдений, активизация Волго-Уральского песчаного природного очага чумы предшествовала регистрации первых находок зараженных животных на территории природных очагов сусликового типа в Северном, Северо-Западном Прикаспии и в Предкавказье. На основе сравнительного полногеномного SNP анализа также установлено, что кратковременная активизация Прикаспийского Северо-Западного степного очага в 1972–1973 гг. вызвана распространением на Ергенинской возвышенности штаммов 2.MED1 из Кавказского региона [21]. Все это позволяет предположить, что причиной синхронной активизации в 1975–1979 гг. группы природных очагов сусликового типа могло стать расширение границ циркуляции штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 2.MED1, в том числе их проникновение в степные и полупустынные ландшафты Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья.

**Целью** настоящей работы явилось установление происхождения штаммов *Y. pestis*, получивших распространение в природных очагах чумы Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья в 70–90-х годах XX в.

### Материалы и методы

#### **Штаммы *Y. pestis*, условия культивирования.**

Использованные в работе штаммы *Y. pestis* получены из Государственной коллекции патогенных бактерий на базе РосНИПЧИ «Микроб», штаммы выращивали на агаре и в бульоне LB в течение 24–48 ч при 28 °С. Культурально-морфологические и биохимические свойства штаммов *Y. pestis* изучали принятыми лабораторно-диагностическими методами [22].

**Полногеномное секвенирование, идентификация SNPs, построение филогенетического дерева.** Для выделения ДНК *Y. pestis* использовали набор PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* проводили в Ion PGM system (Life Technologies). Обработку данных секвенирования выполняли с помощью Ion Torrent Suite software package, 3.4.2 и Newbler gsAssembler 2.6. Полногеномный SNP анализ проводили с помощью программы Wombac 2.0, затем удаляли 28 SNPs в области гомоплазий [23]. Построение филогенетического дерева Maximum Likelihood проводили с помощью программы PhyML 3.1 (500 бутстреп-реплик). Подбор модели нуклеотидных замен выполняли в программах: jMODELTEST 2.1.7, MEGA X. С учетом AIC и BIC критериев выбрана модель GTR.

### Результаты и обсуждение

#### **Свойства штаммов из очагов Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья.**

Всего в исследование взято 22 штамма *Yersinia pestis* из очагов Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья, выделенных за 80-летний период – с 1923 по 2003 год. Исследованы штаммы из Прикаспийского Северо-Западного степного (3 штамма), Волго-Уральского степного (4), Волго-Уральского песчаного (7), Зауральского степного (2), Северо-Приаральского пустынного (2), Приаральско-Каракумского (1), Дагестанского равнинно-предгорного (2) и Центрально-Кавказского высокогорного (1) очагов (табл. 1).

Штаммы выделены от малого суслика *S. pygmaeus* (5 штаммов); полуденной песчанки *M. meridianus* (1); большой песчанки *Rhombomys opimus* (2); полевки *Microtus arvalis* (1); блох *Citellophilus tesquorum*, *Radinopsylla cedestis*, *Ceratophyllus laeviceps*, *Neopsylla setosa* (7), а также от человека (6). Проведен анализ дифференциальных биохимических свойств штаммов и выполнено их полногеномное секвенирование.

Все 22 взятые в исследование штамма обладали типичными для *Y. pestis* культурально-морфологическими признаками и были единообразны по биохимическим свойствам. Они не ферментировали рамнозу и мелибиозу, не редуцировали нитраты, но усваивали глицерин, что означало их принадлежность к средневековому биовару основного подвида *Y. pestis*.

**Филогенетический анализ *Y. pestis* из очагов Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья.** Для построения филогенетического дерева и выяснения филогенетических связей *Y. pestis* из Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья в анализ включены полногеномные последовательности всех 22 взятых в исследование штаммов, а также последовательности 4 штаммов средневекового биовара филогенетических ветвей 2.MED2 (штаммы 91 и K11973002) и 2.MED3 (штаммы CMCC125002 и SHAN11) из очагов Китая, геномы которых представлены в базе данных NCBI GenBank (табл. 1, рисунок).

Для выполнения достоверного филогенетического исследования при построении дендрограммы использованы также нуклеотидные последовательности геномов *Y. pestis* других подвигов и биоваров из NCBI GenBank: CO92 (номер доступа NC\_003143.1), 620024 (№ ADPM00000000), Pestoides\_F (№ NC\_00938), Pestoides\_A (№ NZ\_ACNT00000000), 351001 (№ ADPF00000000), CMCC125002 (№ ADQN00000000). Данные по ним на рисунке не приводятся для улучшения наглядности филогенетического дерева по штаммам средневекового биовара. При проведении полногеномного SNP анализа выявлено 1348 SNPs в коровом геноме 31 включенного в анализ штамма *Y. pestis*.

Все штаммы *Y. pestis* из Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья вошли в одну филогенетическую ветвь средневекового биовара – 2.MED1 (рисунок). На дендрограмме ей предшест-

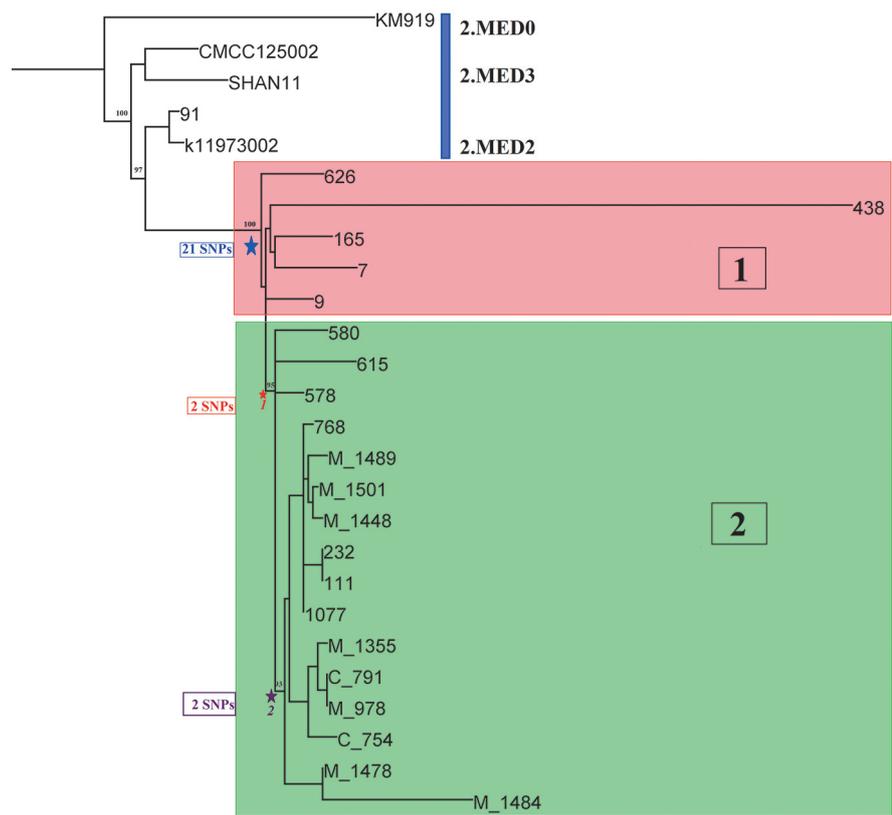
Таблица 1 / Table 1

**Использованные в работе штаммы *Y. pestis***  
**Utilized in the study *Y. pestis* strains**

№ штамма, название и номер очага Strain No, focus designation and No	Объект и год выделения Object and year of isolation	Место выделения Site of isolation	Филогенетическая ветвь Phylogenetic branch
9 Прикаспийский Северо-Западный степной (14) / 9 Caspian Sea region North-Western steppe (14)	Человек, 1923 / Patient, 1923	Ростовская обл., Заветинский р-н, с. Кичкино / Rostov Region, Zavetinsky District, Kichkino village	2.MED1
M-1355 Прикаспийский Северо-Западный степной (14) / M-1355 Caspian Sea region North-Western steppe (14)	<i>Citellophilus tesquorum</i> , 1986	Калмыцкая АССР, Ики-Бурульский р-н / Kalmyk ASSR, Iki-Burulsky District	2.MED1
M-978 Прикаспийский Северо-Западный степной (14) / M-978 Caspian Sea region North-Western steppe (14)	<i>C. pygmaeus</i> , 1990	Калмыцкая АССР, Юстинский р-н, Черные Земли / Kalmyk ASSR, Chernye Zemli	2.MED1
165 Волго-Уральский степной (15) / 165 Volga-Ural steppe (15)	Человек, 1932 / Patient, 1932	Уральская обл., Кзыл-Кутинский р-н / Ural Region, Kzyl-Kuginsky District	2.MED1
438 Волго-Уральский степной (15) / 438 Volga-Ural steppe (15)	<i>Microtus arvalis</i> , 1938	Сталинградская обл., Харабалинский р-н, пос. Нагорное / Stalingrad Region, Kharabalinsky District, Nagornoe settlement	2.MED1
M-1484 Волго-Уральский степной (15) / M-1484 Volga-Ural steppe (15)	<i>C. pygmaeus</i> , 1992	г. Болтай / Boltai City	2.MED1
M-1478 Волго-Уральский степной (15) / M-1478 Volga-Ural steppe (15)	<i>C. pygmaeus</i> , 1992	т. Айгыр / Aigyur	2.MED1
7 Волго-Уральский песчаный (16) / 7 Volga-Ural sandy (16)	Человек, 1922 / Patient, 1922	Западный Казахстан, Букеевская губерния, ур. Каныш-Чагал / Western Kazakhstan, Bukeevskaya government, Kanysh-Chagal	2.MED1
626 Волго-Уральский песчаный (16) / 626 Volga-Ural sandy (16)	Человек, 1945 / Patient, 1945	Западный Казахстан, Гурьевская обл., к/х Амангельды / Western Kazakhstan, Gur'evskaya Region, Amangeldy collective farm	2.MED1
1077 Волго-Уральский песчаный (16) / 1077 Volga-Ural sandy (16)	<i>Radinopsylla cedestis</i> , 1962	Астраханская обл., Красноярский р-н, н.п. Старый Караузек / Astrakhan Region, Krasnoyarsky District, Stary Karauzek community	2.MED1
768 Волго-Уральский песчаный (16) / 768 Volga-Ural sandy (16)	<i>Meriones tamariscinus</i> , 1963	Астраханская обл., Красноярский р-н, н.п. Старый Караузек / Astrakhan Region, Krasnoyarsky District, Stary Karauzek community	2.MED1
111 Волго-Уральский песчаный (16) / 111 Volga-Ural sandy (16)	<i>Ceratophyllus laeviceps</i> , 1971	ур. Тленабул-Истау / Tlenabul-Istau	2.MED1
232 Волго-Уральский песчаный (16) / 232 Volga-Ural sandy (16)	<i>C. laeviceps</i> , 1971	ур. Тленабул-Истау / Tlenabul-Istau	2.MED1
M-1501 Волго-Уральский песчаный (16) / M-1501 Volga-Ural sandy (16)	<i>Meriones meridianus</i> , 1992	ур. Сары / Sary	2.MED1
M-1448 Зауральский степной (17) / M-1448 Trans-Ural steppe (17)	<i>C. pygmaeus</i> , 1990	Чапаевское ПЧО, Есенсайский э/о / Chapaevskoe anti-plague department, Esenaisky anti-epidemic team	2.MED1
M-1489 Зауральский степной (17) / M-1489 Trans-Ural steppe (17)	<i>Rhombomys opinus</i> , 1992	н.п. Коис, Атырауская обл., Кзылкогинский р-н / Kois community, Atyraus Region, Kzylkoginsky District	2.MED1
578 Северо-Приаральский пустынный (21) / 578 North Aral Sea region steppe (21)	Человек, 1945 / Patient, 1945	Казахстан, Кзыл-Ординская обл., Аральский р-н / Kazakhstan, Kzyl-Ordinskaya Region, Aral District	2.MED1
580 Северо-Приаральский пустынный (21) / 580 North Aral Sea region steppe (21)	Человек, 1945 / Patient, 1945	Казахстан, Кзыл-Ординская обл., Аральский р-н / Kazakhstan, Kzyl-Ordinskaya Region, Aral District	2.MED1
615 Приаральско-Каракумский (24) / 615 Aral Sea region Karakumsky (24)	<i>R. opimus</i> , 1945	Казахстан, Кзыл-Ординская обл. / Kazakhstan, Kzyl-Ordinskaya Region	2.MED1
C-754 Дагестанский равнинно-предгорный (03) / C-754 Dagestan plain-piedmont (03)	<i>Neopsylla setosa</i> , 1999	Республика Дагестан, Бабаюртовский р-н., с. Герменчик / Republic of Dagestan, Babayurtovsky District, Germenchik village	2.MED1
C-791 Дагестанский равнинно-предгорный (03) / C-791 Dagestan plain-piedmont (03)	<i>C. pygmaeus</i> , 2003	Республика Дагестан, Бабаюртовский р-н / Republic of Dagestan, Babayurtovsky District	2.MED1
KM 919 Центрально-Кавказский высокогорный (01) / KM 919 Central Caucasian high-mountain (01)	<i>C. tesquorum</i> , 1986	Кабардино-Балкарская АССР, от г. Кызы-Кол аз. 900, 1–2 км, сектор 01342 / Kabardino-Balkaria ASSR	2.MED0
<b>Штаммы <i>Y. pestis</i> из NCBI GenBank / <i>Y. pestis</i> strains from NCBI GenBank</b>			
CMCC125002 № ADQN00000000*	<i>Spermophilus alashanicus</i> , 1964	Ningxia, China	2.MED3
SHAN11 № ADTA000000000*	<i>Nosopsyllus laeviceps kuzenkovii</i> , 2006	Shaanxi, China	2.MED3
91 ADPU000000000*	<i>Marmota himalayana</i> , 1987	Xinjiang, China	2.MED2
K11973002 № NZ_AAYT00000000*	<i>Marmota himalayana</i> , 1973	Xinjiang, China	2.MED2

\*Указан номер доступа в NCBI GenBank number of access entry to NCBI GenBank. В рамках этой работы в базу данных NCBI GenBank депонированы полные геномные последовательности трех штаммов *Y. pestis*: 9 (9\_10) (Accession WUCK00000000), 615 (Accession WUCL00000000), 111 (Accession WUCM00000000).

\*Indicated is number of access entry to NCBI GenBank. As part of this work, whole genome sequences of three *Y. pestis* strains were deposited in the NCBI GenBank database: 9 (9\_10) (Accession WUCK00000000), 615 (Accession WUCL00000000), 111 (Accession WUCM00000000).



Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* из очагов чумы Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья по данным полногеномного SNP анализа. Дендрограмма Maximum likelihood на основе 1348 SNPs построена с помощью PHYML 3.1, модели GTR, 500 бутстрэп-реплик. Звездочками отмечено число SNPs в ключевых узлах дендрограммы

Phylogenetic analysis of *Y. pestis* strains from the plague foci of Northern, North-Western Caspian Sea region and Fore-Caucasus by the data from the whole genome SNP analysis. Maximum likelihood dendrogram is constructed based on 1348 SNPs using PHYML 3.1, GTR models, 500 boot-strap replicas. Asterisks mark the number of SNPs in the core nodes of tree diagram

вуют штаммы трех других ветвей средневекового биовара – 2.MED0 (штамм KM919 из Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы в России), 2.MED2 (91, K11973002) и 2.MED3 (CMCC125002, SHAN11) из очагов Китая. На дендрограмме штаммы 2.MED1 разделились на две отдельные группы, обозначенные на рисунке номерами 1 и 2. Первую группу составили штаммы, выделенные в Северном и Северо-Западном Прикаспии в 1923–1945 гг. В эту группу вошли штаммы *Y. pestis*: 9 (человек, 1923 г.) из Прикаспийского Северо-Западного степного; 165 (человек, 1932 г.) и 438 (*Microtus arvalis*, 1938 г.) из Волго-Уральского степного; 7 (человек, 1922 г.) из Волго-Уральского песчаного очага. Ветви 2.MED1 предшествует штамм *Y. pestis* 626 (человек, 1945 г.) из Волго-Уральского песчаного очага. Штаммы выделены в период с 1922 по 1945 год до наступления длительного межэпизоотического периода, который произошел в очагах чумы Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья в середине XX столетия. На дендрограмме штаммы *Y. pestis* 7, 165 и 438 отходят от базового ствола ветви 2.MED1 общим кластером, а штамм *Y. pestis* 9 – отдельно. Таким образом, в первую группу вошли штаммы *Y. pestis*, выделенные в Северном и Северо-Западном Прикаспии в первой половине XX в.

Вторую большую группу штаммов средневекового биовара ветви 2.MED1 составили штаммы из очагов Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья более позднего периода выделения, 1962–2003 гг. В нее вошли штаммы *Y. pestis*: M-1355 (блохи, 1986 г.) и M-978 (малый суслик, 1990 г.) из Прикаспийского Северо-Западного степ-

ного; M-1484 и M-1478 (малые суслики, 1992 г.) из Волго-Уральского степного; 1077 (блохи, 1962 г.), 768 (гребенщикова песчанка, 1963 г.), 111 (блохи, 1971 г.), 232 (блохи, 1971 г.), M-1501 (полуденная песчанка, 1992 г.) из Волго-Уральского песчаного; M-1448 (малый суслик, 1990 г.) и M-1489 (большая песчанка, 1992 г.) из Зауральского степного; C-754 (блохи, 1999 г.) и C-791 (малый суслик, 2003 г.) из Дагестанского равнинно-предгорного очагов. Таким образом, во вторую группу вошли штаммы, изолированные в Северном, Северо-Западном Прикаспии и Предкавказье от носителей и переносчиков во второй половине XX в. Перерыв во времени выделения штаммов из первого и второго кластера составил по отдельным очагам от 28 до 37 лет. В этот период природные очаги чумы находились в неактивном состоянии (отсутствовали находки зараженных животных и случаи заражения человека).

Как следует из дендрограммы на рисунке, всей группе штаммов 2.MED1 второй половины XX в. из очагов Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья предшествует ветвь, состоящая из штаммов из природных очагов чумы Северного Приаралья. К ним относятся штаммы *Y. pestis* 578 и 580, выделенные от человека в 1945 г. в Северо-Приаральском пустынном очаге, а также штамм 615, полученный от большой песчанки в Приаральско-Каракумском пустынном очаге в 1945 г. Эту ветвь от штаммов 1923–1945 гг. (I группа) отделяют 2 SNPs. (табл. 2). Данные филогенетического анализа свидетельствуют о том, что штаммы из Северного Приаралья предшествуют штаммам современной части ветви 2.MED1 средневекового биовара, которая получила

распространение в очагах Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья после 20–37-летнего отсутствия проявлений чумы в этих очагах. Штаммы средневекового биовара 1923–1945 и 1962–2003 гг. близкородственны друг другу, но в основании второй группы лежат штаммы из Северного Приаралья, что указывает на то, что они являются предками штаммов *Y. pestis*, вызвавших активизацию равнинных и степных очагов чумы в Северном, Северо-Западном Прикаспии и Предкавказье.

Штаммы *Y. pestis* средневекового биовара ветви 2.MED1 1962–2003 гг. разделились на дендрограмме по пространственно-временной принадлежности. Отдельный кластер составили два штамма *Y. pestis*, полученные от малых сусликов в Волго-Уральском степном очаге в 1992 г. Эти штаммы филогенетически удалены от других штаммов этой группы. В другой кластер вошли 11 штаммов из четырех других очагов, которые разделились в свою очередь на еще два подкластера. Один из них составили четыре штамма, полученные от малых сусликов и их блох в Прикаспийском Северо-Западном степном очаге в 1986 и 1990 гг. (штаммы М-1355 и М-978) и в Дагестанском равнинно-предгорном в 1999 и 2003 гг. (С-754 и С-791). Эти штаммы филогенетически близки друг другу и выделены в расположенных рядом очагах чумы Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья. Другой подкластер представлен штаммами из Северного Прикаспия. В его основании расположены штаммы 768 и 1077 из Волго-Уральского песчаного очага 1962–1963 гг. Также от основания этого подкластера парно отошли два штамма – 232 и 111 из этого же природного очага 1971 г. Отдельной группой дивергировали выделенные позже штаммы: М-1501 из Волго-Уральского песчаного очага 1992 г. и два штамма из Зауральского степного очага – М-1489 и М-1448 1990 и 1992 гг. В целом для штаммов из второго подкластера можно предположить, что источником их распространения в Северном Прикаспии были штаммы из Волго-Уральского песчаного очага.

Таким образом, данные проведенного филогенетического анализа на основе полногеномного секвенирования 22 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара 1923–2003 гг. из очагов Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья свидетельствуют о том, что ближайшими филогенетическими предками штаммов, выделенных в этих очагах чумы в 1962–2003 гг., являются штаммы из Северо-Приаральского и Приаральско-Каракумского пустынных очагов чумы 1945 г.

Комплексное исследование свойств штаммов *Y. pestis* из очагов Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья 1923–2003 гг. показало, что они относятся к филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биовара. Эти штаммы были этиологическими агентами вспышек чумы в Прикаспийской низменности в первой половине XX в. По данным анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей 22 секвенированных нами штаммов из этих очагов установлено, что штаммы делятся на две родственные друг другу группы. Первая группа образована штаммами, выделенными в первой, а вторая – во второй половине XX в. Из проведенного сравнительного филогенетического анализа следует, что предшественниками современных штаммов (1962–2003 гг.) ветви 2.MED1 являются штаммы из Северного Приаралья, которые выделяли в Северо-Приаральском и Приаральско-Каракумском пустынных очагах в 1945 г. В свою очередь предшественниками этих штаммов являлись штаммы из Северного Прикаспия более ранних годов выделения. Полученные данные позволяют предположить гипотетический сценарий распространения *Y. pestis* средневекового биовара в Прикаспии и Северном Приаралье в XX в. Ветвь 2.MED1 *Y. pestis*, получившая распространение в Прикаспии на фоне благоприятных климатических условий начала XX в., достигла территорий Северного Приаралья и укоренилась там, вызвав вспышку чумы в Северо-Приаральском пустынном очаге в Кызыл-Ординской

Таблица 2 / Table 2

Характеристика замен единичных нуклеотидов (SNPs), выявленных в ключевых узлах дендрограммы исследуемых штаммов *Y. pestis*

Characteristics of single nucleotide polymorphisms (SNPs) identified in the key nodes of dendrogram of *Y. pestis* strains under study

Позиция SNP по геному референсного штамма CO92 SNP position across the genome of the reference strain CO92	Замена нуклеотида Nucleotide substitution	Характер мутации Nature of mutation	Кодируемый продукт Encoded product	Номер узла на дендрограмме (рис. 1) Node No in the dendrogram (fig. 1)
733490	C → T	Несинонимичная Ser → Phe Nonsynonymous Ser → Phe	Ацилтрансфераза Acyl-transferase	1
2796858	G → A	Несинонимичная Gly → Ser Nonsynonymous Gly → Ser	Гемолизин Hemolysin	1
512182	G → T	Несинонимичная Ala → Ser Nonsynonymous Ala → Ser	Малая субъединица карбамоилфосфатсинтазы Small sub-unit of carbamoyl phosphate synthetase	2
2911550	C → T	Несинонимичная Arg → Cys Nonsynonymous Arg → Cys	ABC-транспортёр ABC-transporter	2

области в 1945 г. Такой же штамм выделен от большой песчанки в Приаральско-Каракумском песчаном очаге в 1945 г., что подтверждает укоренение ветви 2.MED1 в регионе Северного Приаралья. Потепление и повышение аридности европейского юго-востока России в 50–60-х годах прошлого столетия послужило, вероятно, основной причиной отсутствия штаммов *Y. pestis* ветви 2.MED1 в паразитарных системах природных очагов сусликового типа на территории Прикаспийской низменности и Предкавказья. Напротив, в 40–60-е годы прошлого столетия сложились оптимальные условия для циркуляции *Y. pestis* средневекового биовара в Северном Приаралье. Последнее находит косвенное объяснение в асинхронном колебании в XX в. уровней Каспийского и Аральского морей и наступлении периодов повышенного увлажнения. На фоне повышения увлажненности региона Северного Приаралья в 50–60-е годы прошлого столетия отмечена высокая эпизоотическая активность Северо-Приаральского пустынного очага. Это в свою очередь способствовало распространению *Y. pestis* средневекового биовара ветви 2.MED1 по территории северной подзоны пустынной зоны Казахстана, в том числе и в Волго-Уральском междуречье. Изменения границ распространения штаммов ветви 2.MED1 в 40-х годах прошлого столетия с территорий Прикаспийских степей и полупустынь в Северное Приаралье, и в обратном направлении в 1960–1979 гг., с нашей точки зрения, обусловлены асинхронной ритмикой климатических колебаний на территории европейского юго-востока России и региона Северного Приаралья. В дальнейшем в 60–80-х годах XX столетия штаммы из Северного Приаралья получили распространение в очагах Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья. Эпизоотии чумы в этот период первоначально зарегистрированы в Волго-Уральском песчаном очаге. В соответствии с данными эпизоотологического наблюдения активизация степных очагов сусликового типа во второй половине XX в. началась именно с территорий, граничащих с песками Волго-Уральского междуречья. Проведенный филогенетический анализ свидетельствует о том, что штаммы из Волго-Уральского песчаного и Зауральского степного очагов образуют отдельный подкластер, в основании которого лежат штаммы из Волго-Уральского песчаного очага 1962–1963 гг., от которых отходят более поздние штаммы из этих двух очагов. Рядом на дендрограмме расположен подкластер, состоящий из штаммов из Прикаспийского Северо-Западного степного (1986–1990 гг.) и Дагестанского равнинно-предгорного очага (1986–2003 гг.). Отдельный кластер на дендрограмме представлен штаммами 1992 г. из Волго-Уральского степного очага.

Наблюдаемая на территории Прикаспийской низменности и в Предкавказье синхронность развития и прекращения эпизоотий чумы свидетельствует, в первую очередь, об определяющем характере влияния климатических факторов на многолетнюю

динамику эпизоотической активности расположенных здесь природных очагов этой особо опасной инфекции. В связи с этим, в качестве одной из основных причин прекращения эпизоотических проявлений чумы в степных и полупустынных ландшафтах Прикаспийской низменности в 50–60-х годах XX столетия и в начале XXI столетия следует рассматривать аридизацию климата. Напротив, повышение увлажненности территорий Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья в конце 70-х – начале 90-х годов прошлого столетия, совпавшее с подъемом (1978–1995 гг.) уровня Каспийского моря, создало благоприятные условия для расширения границ распространения штаммов *Y. pestis* средневекового биовара ветви 2.MED1 и, как следствие, для синхронной активизации в 1975–1979 гг. расположенных здесь природных очагов чумы сусликового типа.

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

#### Список литературы

1. Кутырев В.В., Попова А.Ю., редакторы. Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 год). Саратов: ООО «Амирит»; 2016. 248 с.
2. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 191 с.
3. Бочарников О.Н., Карпузики К.С., Климченко И.В., Тер-Варганов В.Н., Тинкер И.С., Шишкин А.К., Ширяев Д.Т. Опыт работы по ликвидации чумы в очаге Северо-Западного Прикаспия. В кн.: Савостин Д.Г., ответственный редактор. Природная очаговость и эпидемиология особо опасных инфекционных заболеваний. Саратов; 1959. С. 235–46.
4. Jones S.D., Atshabar B., Schmid B.V., Zuka 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.
5. Золотокрылин А. Н. Климатическое опустынивание. М.: Наука; 2003. 245 с.
6. Сиземская М.Л. Современная природно-антропогенная трансформация почв полупустыни Северного Прикаспия. М.: Товарищество научных изданий КМК; 2013. 276 с.
7. Колчин Е.А., Бармин А.Н., Крыжиновская Г.В., Валов М.В. Особенности климатических изменений аридной территории Российской Федерации. *Геология, география и глобальная энергия.* 2017; 4:113–22.
8. Титкова Т.Б. Изменения климата полупустынь Прикаспия и Тургая в XX веке. Известия РАН. Серия географическая. 2003; 1:106–12.
9. Золотокрылин А.Н., Титкова Т.Б., Черенкова Е.А., Виноградова В.В. Тренды увлажнения и биофизических параметров засушливых земель европейской части России за период 2000–2014 гг. *Современные проблемы дистанционного зондирования земли из космоса.* 2015; 12(2):155–61.
10. Нестеров Е.С., редактор. Водный баланс и колебания уровня Каспийского моря. Моделирование и прогноз. М.: Триада; 2016. 370 с.
11. Попов Н.В., Удовиков А.И., Ерошенко Г.А., Караваева Т.Б., Яковлев С.А., Поршаков А.М., Зенкевич Е.С., Кутырев В.В. Влияние колебаний Каспийского моря на эпизоотическую активность Прикаспийского песчаного природного очага чумы. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни.* 2016; 1:12–7.
12. Танитовский В.А., Майканов Н.С. Предположительные причины снижения эпизоотической активности очагов чумы Северного Прикаспия. Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. Алматы. 2019; 1(38):127–31.
13. Khasnis AA, Nettleman MD. Global warming and infectious diseases. *Arch. Med. Res.* 2005; 36:689–96.
14. Stenseth N.C., Samia N.I., Viljugrein H., Kausrud K.L., Begon M., Davis S., Leirs H., DUBYANSKIY V.M., Esper J., Ageyev V.S., Klassovskiy N.L., Pole S.B., Chan K.-S. Plague dynamics are driven by climate variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(35):13110–15. DOI: 10.1073/pnas.0602447103.
15. Kausrud K.L., Viljugrein H., Frigessi A., Begon M., Davis S., Leirs H., DUBYANSKIY V., Stenseth N.C. Climatically driven syn-

chrony of gerbil populations allows large-scale plague outbreaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 274(1621):1963–9. DOI: 10.1098/rspb.2007.0568.

16. Nakazawa Y., Williams R., Peterson A.T., Mead P., Staples E., Gage K.L. Climate change effects on plague and tularemia in the United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007; 7(4):529–40. DOI: 10.1089/vbz.2007.0125.

17. Snäll T., O'Hara R.B., Ray C., Collinge S.K. Climate-driven spatial dynamics of plague among prairie dog colonies. *Am. Nat.* 2008; 171(2):238–48. DOI: 10.1086/525051.

18. Ben Ari T., Neerinckx S., Gage K.L., Kreppel K., Laudoisot A., Leirs H., Stenseth N.C. Plague and Climate: Scales Matter. *PLoS Pathog.* 2011; 7(9):e1002160. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002160.

19. Kut'yrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'hova 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.

20. Eroshenko G.A., 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; 3:51–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-51-57.

21. Eroshenko G.A., Попов Н.В., Альхова Ж.В., Балькова А.Н., Куклева Л.М., Кутырев В.В. Филогенетический анализ штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара, выделенных в Прикаспийском Северо-Западном степном очаге чумы в XX столетии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 2:55–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-55-61.

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

23. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Lucy A Weinert, 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.

**References**

1. Kut'yrev V.V., Popova A. Yu., editors. [Cadastre of Epidemic and Epizootic Plague Manifestations in the Territory of the Russian Federation and Neighboring Countries (between 1876 and 2016)]. Saratov: “Amirit” LLC; 2016. 248 p.

2. Onishchenko G.G., Kut'yrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia, and Siberia]. М.: “Meditsina”; 2004. 191 p.

3. Bocharnikov O.N., Karpuzidi K.S., Klimchenko I.V., Ter-Vartanov V.N., Tinker I.S., Shishkin A.K., Shiryayev D.T. [Experience in eradication of plague in the focus of North-Western Caspian Sea region]. In: [Natural Focality and Epidemiology of Particularly Dangerous Infectious Diseases]. Saratov; 1959. P. 235–46.

4. Jones S.D., Atshabar B., Schmid B.V., Zuka 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.

5. Zolotokrylin A.N. [Climatic Desertification]. М.: “Nauka”; 2003. 245 p.

6. Sizemskaya M.L. [Modern Natural-Anthropogenic Transformation of Semi-Desert Soils of Northern Caspian Sea Region]. М.: 2013. 276 p.

7. Kolchin E.A., Barmin A.N., Kryzhinovskaya G.V., Valov M.V. [Peculiarities of climate changes of arid territories of the Russian Federation]. *Geologiya, Geografiya i Global'naya Energiya. [Geology, Geography, and Global Energy]*. 2017; 4:113–22.

8. Titkova T.B. [Climate changes in semi-desert areas of Caspian Sea region and Turgai in the XX century]. *RAS Bulletin. Geography series*. 2003; 1:106–12.

9. Zolotokrylin A.N., Titkova T.B., Cherenkova E.A., Vinogradova V.V. [Trends in hydration and biophysical parameters of arid lands in the European part of Russia over the period of 2000–2014]. *Sovremennye Problemy Distantionnogo Zondirovaniya Zemli iz Kosmosa. [Current Problems of Earth Remote Probing from Space]*. 2015; 12(2):155–61.

10. Nesterov E.S., editor. [Water Balance and Fluctuations in the Level of the Caspian Sea. Modeling and Forecasting]. М.: “Triada”; 2016. 370 p.

11. Popov N.V., Udovikov A.I., Eroshenko G.A., Karavaeva T.B., Yakovlev S.A., Porshakov A.M., Zenkevich E.S., Kut'yrev V.V.

[Effect of Caspian Sea level fluctuations on epizootic activity of Pre-Caspian sandy natural plague focus]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnyye Bolezni [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2016; 1:12–7.

12. Tanitovskiy V.A., Maikanov N.S. [Alleged causes of decrease in epizootic activity of plague foci in the Northern Caspian Sea region]. *Karantinnyye i Zoonoznyye Infektsii v Kazakhstane. [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. Almaty. 2019; 1(38):127–31.

13. Khasnis AA, Nettleman MD. Global warming and infectious diseases. *Arch. Med. Res.* 2005; 36:689–96.

14. Stenseth N.C., Samia N.I., Viljugrein H., Kausrud K.L., Begon M., Davis S., Leirs H., Dubyanskiy V.M., Esper J., Ageyev V.S., Klassovskiy N.L., Pole S.B., Chan K.-S. Plague dynamics are driven by climate variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(35):13110–15. DOI: 10.1073/pnas.0602447103.

15. Kausrud K.L., Viljugrein H., Frigessi A., Begon M., Davis S., Leirs H., Dubyanskiy V., Stenseth N.C. Climatically driven synchrony of gerbil populations allows large-scale plague outbreaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 274(1621):1963–9. DOI: 10.1098/rspb.2007.0568.

16. Nakazawa Y., Williams R., Peterson A.T., Mead P., Staples E., Gage K.L. Climate change effects on plague and tularemia in the United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007; 7(4):529–40. DOI: 10.1089/vbz.2007.0125.

17. Snäll T., O'Hara R.B., Ray C., Collinge S.K. Climate-driven spatial dynamics of plague among prairie dog colonies. *Am. Nat.* 2008; 171(2):238–48. DOI: 10.1086/525051.

18. Ben Ari T., Neerinckx S., Gage K.L., Kreppel K., Laudoisot A., Leirs H., Stenseth N.C. Plague and Climate: Scales Matter. *PLoS Pathog.* 2011; 7(9):e1002160. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002160.

19. Kut'yrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'hova 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.

20. Eroshenko G.A., Попов Н.В., Альхова Ж.В., Балькова А.Н., Куклева Л.М., Червякова Н.С., Майканов Н.С., Сармулдина А.Х., Кутырев В.В. [Circulation of *Yersinia pestis* in the Volga-Ural sandy focus: spatiotemporal analysis]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:51–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-51-57.

21. Eroshenko G.A., Попов Н.В., Альхова Ж.В., Балькова А.Н., Куклева Л.М., Кутырев В.В. [Phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* strains of Medieval biovar, isolated in Precaspian North-Western steppe plague focus in the XX century]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 2:55–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-55-61.

22. Onishchenko G.G., Kut'yrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. М.: CJSC «Shiko»; 2013: 560 p.

23. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Lucy A Weinert, 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.

**Authors:**

Eroshenko G.A., Popov N.V., Al'hova Zh.V., Kukleva L.M., Balykova A.N., Grazhdanov A.K., Kut'yrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Ayazbaev T.Z. M. Aikimbaev National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections. Almaty, Republic of Kazakhstan.

Maikanov N.S. Ural Plague Control Station. Uralsk, Republic of Kazakhstan

**Об авторах:**

Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Альхова Ж.В., Куклева Л.М., Балькова А.Н., Гражданов А.К., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Аязбаев Т.З. Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Аикимбаева. Республика Казахстан, Алматы

Майканов Н.С. Уральская противочумная станция. Республика Казахстан, Уральск

Поступила 29.10.19.

Принята к публ. 10.12.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-56-60

УДК 616.98:579.842.11(470.44)

А.В. Казанцев<sup>1,2</sup>, Н.А. Осина<sup>1</sup>, Т.О. Глинская<sup>3</sup>, О.Н. Кошелева<sup>3</sup>, Ю.В. Максимов<sup>3</sup>, З.Л. Девдариани<sup>1</sup>,  
А.Н. Микеров<sup>2</sup>**ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УРОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ г. САРАТОВА**

<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, Российская Федерация; <sup>3</sup>ГУЗ «Саратовская городская клиническая больница № 8», Саратов, Российская Федерация

**Цель.** Молекулярно-генетическая характеристика штаммов уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных из мочи пациентов с инфекциями мочевыводящих путей на территории Саратова, с целью определения принадлежности к филогенетическим группам и подгруппам и выявления генетических маркеров, ассоциированных с вирулентностью. **Материалы и методы.** Исследовано 102 штамма уропатогенных *E. coli*, выделенных из мочи пациентов с инфекциями мочевыводящих путей. Методом ПЦР определяли частоту встречаемости генов (*fimH*, *pap*, *sfa*, *afa*, *iha*, *irp2*, *iuc*, *iroN*, *hlyA*, *vat*, *usp*, *set-1*, *kpsMT*, *iss*, *cva*, *ompT*), ассоциированных с факторами адгезии, утилизации железа, токсигенности, устойчивости к действию сыворотки (комплемента) и персистенции, а также принадлежность к конкретным филогенетическим группам и подгруппам (путем амплификации генов *chuA*, *yjaA* и TspE4.C2). **Результаты и обсуждение.** Установлено, что исследованные штаммы *E. coli* принадлежали к различным филогенетическим группам и подгруппам (A<sub>1</sub>, B1, B2<sub>3</sub>, D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub>) и различались набором генов, кодирующих основные факторы вирулентности. При этом частота выявления уропатогенных *E. coli*, относящихся к подгруппе B2<sub>3</sub>, оказалась преобладающей. Более того, штаммы данной филогенетической подгруппы отличались наибольшим набором генов, кодирующих факторы вирулентности возбудителя. У всех изученных штаммов уропатогенных *E. coli*, принадлежащих к различным филогенетическим группам и подгруппам, выявлено наличие генов, ответственных за синтез сидерофоров (*irp2*, *iuc*, *iroN*), устойчивости и персистенции (*ompT*) и факторов адгезии (*fimH*, *iha*). Таким образом, штаммы уропатогенных *E. coli*, выделенные от пациентов с инфекциями мочевыводящих путей в Саратове, принадлежат к различным филогенетическим группам и подгруппам и обладают различным набором генетических маркеров вирулентности, что может оказывать влияние на степень патогенности возбудителя и отражаться на тяжести течения и длительности заболевания.

**Ключевые слова:** уропатогенные *Escherichia coli*, факторы вирулентности, филогенетическая характеристика.

Корреспондирующий автор: Казанцев Андрей Васильевич, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

Для цитирования: Казанцев А.В., Осина Н.А., Глинская Т.О., Кошелева О.Н., Максимов Ю.В., Девдариани З.Л., Микеров А.Н. Факторы вирулентности и филогенетическая характеристика уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных на территории г. Саратова. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:56–60. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-56-60.

A.V. Kazantsev<sup>1,2</sup>, N.A. Osina<sup>1</sup>, T.O. Glinskaya<sup>3</sup>, O.N. Kosheleva<sup>3</sup>, Yu.V. Maksimov<sup>3</sup>, Z.L. Devdariani<sup>1</sup>,  
A.N. Mikerov<sup>2</sup>**Virulence Factors and Phylogenetic Characteristics of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated in Saratov**

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation; <sup>2</sup>V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, Russian Federation; <sup>3</sup>Saratov City Clinical Hospital No 8, Saratov, Russian Federation

**Abstract. Objective** of this study was the molecular genetic characteristics of uropathogenic strains of *Escherichia coli*, isolated from urine of patients with urinary tract infections in Saratov City, in order to determine the phylogenetic groups and subgroups to which the strains belong, and to identify the genetic markers associated with virulence. **Materials and methods.** Molecular genetic characteristics of 102 strains of uropathogenic *E. coli* which were isolated from urine of patients with urinary tract infections, was performed. PCR was used to determine the frequency of occurrence of genes (*fimH*, *pap*, *sfa*, *afa*, *iha*, *irp2*, *iuc*, *iroN*, *hlyA*, *vat*, *usp*, *set-1*, *kpsMT*, *iss*, *cva*, *ompT*) associated with factors of adhesion, iron intake, toxigenicity, resistance to action of serum (complement) and persistence, as well as belonging of studied strains to the specific phylogenetic groups and subgroups (by amplification of genes *chuA*, *yjaA* and TspE4.C2). **Results and discussion.** It was revealed that *E. coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in Saratov city belonged to different phylogenetic groups and subgroups (A<sub>1</sub>, B1, B2<sub>3</sub>, D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub>) and differed in their set of genes, which encode the basic virulence factors. At the same time, detection of uropathogenic *E. coli* which belong to the B2<sub>3</sub> subgroup was the most frequent. Moreover, the strains of this phylogenetic subgroup differed from others in the largest set of genes which encode virulence factors of the etiological agent. In all studied strains of uropathogenic *E. coli* which belong to different phylogenetic groups and subgroups the presence of genes responsible for the synthesis of siderophores (*irp2*, *iuc*, *iroN*), resistance and persistency (*ompT*) and adhesion factors (*fimH*, *iha*) was revealed. Therefore, strains of uropathogenic *E. coli* isolated from patients with urinary tract infections in Saratov city belong to different phylogenetic groups and subgroups and have a different set of genetic markers of virulence that can affect the degree of pathogenicity of the etiological agent, and the course of the disease.

**Key words:** uropathogenic *Escherichia coli*, virulence factors, phylogenetic characteristics.

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

**Corresponding author:** Andrei V. Kazantsev, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

**Citation:** Kazantsev A.V., Osina N.A., Glinskaya T.O., Kosheleva O.N., Maksimov Yu.V., Devdariani Z.L., Mikerov A.N. Virulence Factors and Phylogenetic Characteristics of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated in Saratov. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:56–60. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-56-60

Received 09.12.19. Revised 12.12.19. Accepted 20.12.19.

*Escherichia coli* – комменсальный микроорганизм, населяющий нижние отделы кишечника человека и животных. Однако некоторые штаммы *E. coli* могут вызывать заболевания как кишечной, так и внекишечной локализации. Например, внекишечные патогенные *E. coli*, ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*), наиболее часто вызывают такие заболевания внекишечной локализации, как инфекции мочевыводящих путей (ИМП). Основным этиологическим агентом ИМП является уропатогенная *E. coli* (УПЭК). При бактериологическом исследовании мочи у пациентов с ИМП данный микроорганизм выделяется в 50–90 % случаев [1, 2]. По данным литературы, вирулентность УПЭК при ИМП связывалась с наличием у них адгезинов, систем захвата и утилизации ионов железа (сидерофоры), токсинов, а также механизмов, позволяющих противостоять иммунной защите макроорганизма [3, 4].

Штаммы *E. coli* принадлежат к четырем основным филогенетическим группам – А, В1, В2 и D. Внутри групп А, В2 и D выделяют подгруппы – А<sub>0</sub> и А<sub>1</sub>, В<sub>2</sub><sub>2</sub> и В<sub>2</sub><sub>3</sub>, D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub> соответственно [5, 6]. При этом разделение на группы и подгруппы проводят на основании наличия или отсутствия в геноме возбудителя генов *chuA*, *yjaA* и *TspE4.C2* [5, 6]. Согласно данным литературы [7], штаммы *E. coli*, вызывающие заболевания кишечной локализации, обычно принадлежат к филогенетическим группам А, В1 и D, тогда как представители патотипа ExPEC, в который включены УПЭК, чаще принадлежат к филогенетической группе В2 и реже – к группе D.

Изучение принадлежности штаммов УПЭК, циркулирующих на определенной территории, к конкретным филогенетическим группам и подгруппам, а также изучение факторов вирулентности возбудителя, необходимы для лучшего понимания патогенеза ИМП и, соответственно, улучшения качества лечения пациентов с ИМП. Однако на территории Саратовской области такие исследования до сих пор не проводились.

**Цель работы** – молекулярно-генетическая характеристика штаммов уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных из мочи пациентов с инфекциями мочевыводящих путей на территории Саратова, для определения принадлежности к филогенетическим группам и подгруппам и выявления генетических маркеров, ассоциированных с вирулентностью.

## Материалы и методы

Культуры бактерий *E. coli* выделяли из средней порции мочи от 102 пациентов (женщин –

72 %, мужчин – 28 %) с ИМП, находящихся на стационарном лечении в урологических отделениях Государственного учреждения здравоохранения «Саратовская городская клиническая больница № 8» (ГУЗ «СГКБ № 8») в период 2017–2018 гг. Все клинические штаммы УПЭК (102 штамма) выделяли в клинико-диагностической лаборатории ГУЗ «СГКБ № 8» из мочи пациентов со степенью бактериурии  $\geq 10^5$  КОЕ/мл. Данное исследование одобрено на заседании этической комиссии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» (протокол № 9 от 07.06.2016 г.). От всех пациентов, ставших объектами исследования, получено информированное согласие.

Расширенную идентификацию выделенных штаммов УПЭК проводили на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» с использованием автоматического микробиологического анализатора VITEK 2 Compact (Bio-Merieux, Франция) и применением карт VITEK 2 Gram-Negative identification card (GN). После идентификации, культуры *E. coli* хранили в протеозопептоне (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Индия) с 50 % глицерина при температуре -40 °С до начала исследования.

Выделение ДНК осуществляли с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия) согласно прилагаемой инструкции производителя. Для постановки ПЦР использовали полученные препараты ДНК в концентрации 1 нг/мкл. Последовательности праймеров, использованных в данной работе для амплификации фрагментов генов *fimH*, *chuA*, *yjaA* и участка ДНК *TspE4.C2*, описаны ранее в работе K.W. Yan *et al.* [8], а последовательности праймеров для амплификации фрагментов генов *pap*, *sfa*, *afa*, *iha*, *irp2*, *iuc*, *iroN*, *hlyA*, *vat*, *usp*, *set-1*, *kpsMT*, *iss*, *cva*, *ompT* – в работе Н. Momtaz *et al.* [9]. При проведении ПЦР использовали 10-кратный ПЦР буфер Б (ЗАО «Синтол», Россия), 25 мМоль раствор дНТФ (ЗАО «Синтол», Россия), 25 мМоль раствор MgCl<sub>2</sub> (ЗАО «Синтол», Россия), SynTaq ДНК-полимеразу (ЗАО «Синтол», Россия). Реакционная смесь для проведения реакции включала одну из 19 пар праймеров в концентрации 12 пМоль каждого, 0,2 мМоль дНТФ, 2 мМоль MgCl<sub>2</sub>, 2 ед. ДНК-полимеразы, 10 мкл препарата ДНК. Деионизированную воду (Thermo Fisher Scientific, США) добавляли в реакционную смесь до конечного объема 25 мкл.

Определение принадлежности штаммов УПЭК к филогенетическим группам осуществляли на основании результатов амплификации фрагментов генов *chuA* и *yjaA*, а также фрагмента ДНК *TspE4.C2* [5, 6].

Аmplификацию проводили в термоциклере Mastercycler nexus (Eppendorf, Германия) по следующей программе: денатурация 95 °С в течение 5 мин с последующими 35 циклами, каждый из которых состоял из денатурации при 95 °С в течение 30 с, отжига праймеров при определенной температуре в течение 30 с, элонгации при 72 °С в течение 30 с; конечное удлинение при 72 °С в течение 5 мин. Температура отжига праймеров, составила: *iuc* – 52 °С, *set-1* – 54 °С, *vat* – 55 °С; *iss* – 56 °С; *irp2*, *kpsMT* – 58 °С; *ompT* – 59 °С; *cva*, *usp*, *chuA* – 60 °С; *yjaA* – 61 °С; TspE4.C2, *hlyA* – 62 °С; *iroN*, *pap*, *fimH* – 63 °С; *sfa*, *iha* – 64 °С; *afa* – 65 °С. Для подтверждения наличия ожидаемых продуктов ПЦР по завершении амплификации 10 мкл образца каждой ПЦР-реакции подвергали электрофорезу в 2 % агарозном геле, содержащем бромид этидия. Визуализацию полученных результатов проводили с использованием геледокументирующей системы Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories, США) при УФ-флуоресценции путем сопоставления треков полученных образцов с маркерами молекулярных масс – 50 bp DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder, 123 bp DNA Ladder, 250 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия  $\chi^2$  с поправкой Йейтса с помощью программы SigmaStat (версия 3.5; Dundas software LTD., Германия и TE Sub Systems, Inc.). Различия считались достоверными, если  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

На первом этапе работы определена принадлежность изучаемых штаммов УПЭК к филогенетическим группам и подгруппам (таблица). В ходе анализа обнаружено, что в 52,9 % случаев (54 штамма) выделенные микроорганизмы принадлежали к подгруппе B<sub>2</sub> (*chuA*<sup>+</sup> *yjaA*<sup>+</sup> TspE4.C2<sup>+</sup>), в 16,7 % случаев (17 штаммов) – к подгруппе A<sub>1</sub> (*chuA*<sup>+</sup> *yjaA*<sup>+</sup> TspE4.C2<sup>-</sup>), в 10,8 % случаев (по 11 штаммов) – к подгруппе D<sub>2</sub> (*chuA*<sup>+</sup> *yjaA*<sup>-</sup> TspE4.C2<sup>+</sup>) или к группе B1 (*chuA*<sup>-</sup> *yjaA*<sup>-</sup> TspE4.C2<sup>+</sup>), а в 8,8 % случаев (9 штаммов) – к подгруппе D<sub>1</sub> (*chuA*<sup>+</sup> *yjaA*<sup>-</sup> TspE4.C2<sup>-</sup>). При этом в изучаемой выборке штаммов УПЭК филогенетические подгруппы A<sub>0</sub> и B<sub>2</sub> не выявлены. Таким образом, в исследуемой выборке штаммов УПЭК выявлено преобладание филогенетической подгруппы B<sub>2</sub>, что соответствует литературным данным по исследованию частоты встречаемости данной подгруппы среди культур *E. coli*, выделенных из мочи пациентов с ИМП [4].

У штаммов филогенетических групп B2 и D, которые наиболее часто принадлежат к УПЭК, выявлено наличие определенного набора факторов вирулентности, способствующих выживанию, колонизации и персистенции возбудителя в мочевыводящих путях [4, 10, 11]. В данной работе гены, кодирующие основные факторы вирулентности штаммов УПЭК,

являющихся возбудителями ИМП, распределены среди четырех групп, как описано ниже, на основании общепринятых литературных данных [12–15]. В связи с этим определено наличие у исследуемых штаммов генов *fimH*, *sfa*, *pap*, *afa* и *iha*, ассоциированных с адгезией и кодирующих соответственно фимбрии I типа, S-фимбрии, P-фимбрии, афимбриальный и негемагглютинирующий адгезин (гомолог адгезина IrgA *E. coli* O157:H7); генов *kpsMT*, *iss*, *ompT* и *cva*, ассоциированных с персистенцией и кодирующих капсульный липолисахарид К-антиген (II группа), фактор устойчивости к действию сыворотки (комплемента), протеазу наружной мембраны и колицины V соответственно; генов *iroN*, *iuc*, *irp2*, отвечающих за синтез компонентов системы утилизации железа – сидерофоров энтеробактина (сальмохелина), аэробактина и иерсиниабактина соответственно; генов *hlyA*, *usp*, *vat* и *set-1*, определяющих секрецию токсинов и белков –  $\alpha$ -гемолизина, уропатогенного специфического белка, вакуолизирующего автотранспортного токсина и Шигелла-энтеротоксина-1 соответственно. Частота встречаемости данных генов определена для всех идентифицированных групп и подгрупп УПЭК. Результаты исследования представлены в таблице.

Анализ факторов вирулентности, связанных с адгезией возбудителя показал, что частота встречаемости гена *pap* статистически достоверно отличалась у штаммов УПЭК, принадлежащих к филогенетическим подгруппам A<sub>1</sub> и B<sub>2</sub> ( $p=0,022$  и  $p=0,016$ , соответственно). У штаммов УПЭК, принадлежащих к филогенетической группе B1, также выявлены статистически достоверные различия в частоте встречаемости гена *iha* ( $p=0,029$ ).

При анализе частоты встречаемости генов, ассоциированных с факторами устойчивости к действию сыворотки (комплемента) и персистенции, статистически достоверные различия выявлены во всех группах и подгруппах, кроме D<sub>1</sub>. Частота встречаемости гена *kpsMT* у штаммов УПЭК в филогенетических подгруппах A<sub>1</sub> и B<sub>2</sub> характеризовалась высокой степенью статистически достоверных различий ( $p \leq 0,001$  и  $p \leq 0,001$  соответственно). Среди штаммов, принадлежащих к филогенетической группе B1, достоверные различия выявлены для гена *iss* ( $p \leq 0,001$ ). Среди представителей филогенетических подгрупп A<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> и D<sub>2</sub> выявлены статистически достоверные различия для гена *ompT* ( $p=0,002$ ,  $p \leq 0,001$  и  $p=0,013$  соответственно). Кроме того, частота встречаемости гена *cva* у штаммов УПЭК, принадлежавших к филогенетической группе B1 также статистически достоверно отличалась ( $p=0,007$ ).

Частота встречаемости гена *irp2*, ответственно за синтез сидерофоров (иерсиниабактина), статистически достоверно отличалась в филогенетической группе B1 и подгруппах A<sub>1</sub> и B<sub>2</sub> ( $p \leq 0,001$ ,  $p=0,041$  и  $p=0,003$  соответственно). Кроме того, у штаммов УПЭК, принадлежавших к филогенетической группе B1, выявлены достоверные различия частоты встре-

**Частота встречаемости генов, кодирующих основные факторы вирулентности у исследованных штаммов уропатогенных *E. coli* (УПЭК), относящихся к разным филогенетическим группам и подгруппам**

**Frequency of occurrence of the genes which encode the major virulence factors in the studied strains of uropathogenic *E. coli* (UPEC) that belong to different phylogenetic groups and subgroups**

Факторы вирулентности Virulence factors	Ген Gene	Частота встречаемости генов у штаммов УПЭК, относящихся к разным филогенетическим группам и подгруппам, n (%) Frequency of occurrence of genes in UPEC strains that belong to different phylogenetic groups and subgroups, n (%)					Общая частота встречаемости генов у всех исследованных штаммов, принадлежащих к филогенетическим группам и подгруппам, n (%) The general frequency of occurrence of genes in all studied strains belonging to the phylogenetic groups and subgroups, n (%)
		A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub> <sub>3</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	
Адгезия Adhesion	<i>fimH</i>	16 (94,1)	11 (100,0)	54 (100,0)	9 (100,0)	11 (100,0)	101 (99,0)
	<i>sfa</i>	0	0	15 (27,8)	0	0	15 (14,7)
	<i>pap</i>	*4- (23,5) <i>p</i> =0,022	0	*42+ (77,8) <i>p</i> =0,016	6 (66,7)	6 (54,5)	58 (56,9)
	<i>afa</i>	1 (5,9)	0	2 (3,7)	0	2 (18,2)	5 (4,9)
	<i>iha</i>	7 (41,2)	*2- (18,2) <i>p</i> =0,029	37 (68,5)	7 (77,8)	6 (54,5)	59 (57,8)
Устойчивость к действию сыворотки (комплемента) и персистенция Resistance to action of serum (complement) and persistence	<i>kpsMT</i>	*3- (17,6) <i>p</i> ≤0,001	0	*54+ (100,0) <i>p</i> ≤0,001	6 (66,7)	8 (72,7)	71 (69,6)
	<i>iss</i>	6 (35,3)	*8+ (72,7) <i>p</i> ≤0,001	6 (11,1)	0	1 (9,1)	21 (20,6)
	<i>ompT</i>	*6- (35,3) <i>p</i> =0,002	8 (72,7)	*54+ (100,0) <i>p</i> ≤0,001	6 (66,7)	*4- (36,4) <i>p</i> =0,013	78 (76,5)
	<i>cva</i>	0	*5+ (45,5) <i>p</i> =0,007	6 (11,1)	0	0	11 (10,8)
Сидерофоры Siderophores	<i>iroN</i>	5 (29,4)	*8+ (72,7) <i>p</i> =0,043	20 (37,0)	2 (22,2)	2 (18,2)	37 (36,3)
	<i>iuc</i>	10 (58,8)	10 (90,9)	43 (79,6)	7 (77,8)	8 (72,7)	78 (76,5)
	<i>irp2</i>	*9- (52,9) <i>p</i> =0,041	*3- (27,3) <i>p</i> ≤0,001	*53+ (98,1) <i>p</i> =0,003	7 (77,8)	9 (81,8)	81 (79,4)
Токсигенность Toxicogenicity	<i>hlyA</i>	*1- (5,9) <i>p</i> =0,009	0	*36+ (66,7) <i>p</i> =0,006	2 (22,2)	4 (36,4)	43 (42,2)
	<i>usp</i>	*1- (5,9) <i>p</i> ≤0,001	0	*54+ (100,0) <i>p</i> ≤0,001	3 (33,3)	*2- (18,2) <i>p</i> =0,024	60 (58,8)
	<i>vat</i>	0	0	*21+ (38,9) <i>p</i> =0,049	0	2 (18,2)	23 (22,5)
	<i>set-1</i>	1 (5,9)	0	3 (5,6)	0	2 (18,2)	6(5,9)
<i>Итого:</i> <i>Total:</i>		n=17 (16,7 %)	n=11 (10,8 %)	n=54 (52,9 %)	n=9 (8,8 %)	n=11 (10,8 %)	n=102 (100,0 %)

*Примечание:* n – количество штаммов, в данной группе или подгруппе.

\* – достоверные различия (*p*<0,05) между частотой встречаемости данного гена в конкретной филогенетической группе или подгруппе и частотой встречаемости этих генов в общей выборке штаммов УПЭК (во всех филогенетических группах и подгруппах).

- – частота встречаемости гена в группе или подгруппе меньше частоты встречаемости этого же гена в общей выборке.

+ – частота встречаемости гена в группе или подгруппе выше частоты встречаемости этого же гена в общей выборке.

Всего исследовано 102 штамма УПЭК. В скобках показан % встречаемости данного гена в филогенетической группе или подгруппе.

*Note:* n - is the number of strains in a given group or subgroup.

\* – significant differences (*p*<0.05) between the frequency of occurrence of this gene in a particular phylogenetic group or subgroup and the frequency of occurrence of these genes in the overall sample of UPEC strains (in all phylogenetic groups and subgroups).

- – the frequency of occurrence of gene in the group or subgroup is less than the frequency of occurrence of the same gene in the overall sample.

+ – the frequency of occurrence of gene in the group or subgroup is higher than the frequency of occurrence of the same gene in the overall sample.

Totally, 102 UPEC strains were studied. In parentheses, the % of occurrence of the gene in the phylogenetic group or subgroup is shown.

чаемости гена *iroN* (*p*=0,043).

У штаммов УПЭК, принадлежащих к филогенетическим подгруппам A<sub>1</sub> и B<sub>2</sub><sub>3</sub>, статистически достоверные различия выявлены в частоте встречаемости генов *hlyA* и *usp*, ассоциированных с факторами токсигенности (*hlyA*: *p*=0,009 и *p*=0,006 соответственно и *usp*: *p*≤0,001 и *p*≤0,001 соответственно). Частота встречаемости гена *vat* среди представителей филогенетической подгруппы B<sub>2</sub><sub>3</sub> и частота встречаемости гена *usp* в филогенетической подгруппе D<sub>2</sub> также

статистически достоверно отличалась (*p*=0,049 и *p*=0,024 соответственно).

Таким образом, результаты проведенной работы свидетельствуют о том, что штаммы УПЭК, выделенные из мочи пациентов с ИМП на территории Саратова, принадлежат к различным филогенетическим группам и подгруппам (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub><sub>3</sub>, D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub>) и различаются количеством и частотой встречаемости генов, кодирующих основные факторы вирулентности. У всех изученных штаммов уропатогенных *E. coli*,

принадлежащих к различным филогенетическим группам и подгруппам, выявлено наличие генов, ответственных за синтез сидерофоров (*irp2*, *iuc*, *iroN*), устойчивости и персистенции (*ompT*) и факторов адгезии (*fimH*, *iha*). Частота встречаемости других генов была вариабельна. Обнаружено, что большинство штаммов УПЭК, циркулирующих на территории Саратова, принадлежали к филогенетической подгруппе B<sub>2</sub>. Данная подгруппа характеризуется наибольшим набором генов, кодирующих факторы вирулентности возбудителя, что может способствовать более быстрому течению патологического процесса при развитии ИМП. Кроме того, на территории Саратова также выявлены штаммы УПЭК, которые принадлежали к филогенетическим группам B1 и подгруппам A<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub>. При этом наименьшее количество генов, кодирующих факторы вирулентности, свойственно штаммам УПЭК, принадлежащих к филогенетической группе B1. Результаты проведенного исследования также выявили противоположные тенденции в частоте встречаемости генов, отвечающих за вирулентность в различных филогенетических группах и подгруппах. Например, группа B<sub>2</sub> характеризовалась статистически достоверно более высокой частотой встречаемости 7 из 16 исследованных генов, отвечающих за вирулентность возбудителя. В то же время, у представителей подгруппы A<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub> частота встречаемости генов, отвечающих за вирулентность, либо не отличалась от общей выборки штаммов УПЭК, либо была статистически достоверно ниже. Это может свидетельствовать о различной эффективности представителей различных филогенетических групп и подгрупп, циркулирующих в Саратовском регионе, в колонизации мочевыделительной системы при развитии ИМП, что может, в свою очередь, отражаться на тяжести и длительности течения заболевания. Поэтому при лечении пациентов с ИМП необходимо учитывать принадлежность возбудителя к филогенетическим группам и подгруппам.

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

### Список литературы / References

- Shah C., Baral R., Bartaula B., Shrestha L.B. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiol.* 2019; 19(1):204. DOI: 10.1186/s12866-019-1587-3.
- Sheikh A.F., Goodarzi H., Yadyad M.J., Aslani S., Amin M., Jomehzadeh N., Ranjbar R., Moradzadeh M., Azarpira S., Akhond M.R., Hashemzadeh M. Virulence-associated genes and drug susceptibility patterns of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12:2039–47. DOI: 10.2147/IDR.S199764.
- Kudinha T. The pathogenesis of *Escherichia coli* urinary tract infection. In: Samie A., editor. *Escherichia coli – recent advances on physiology, pathogenesis and biotechnological applications*. 1st ed. Croatia: IntechOpen; 2017. P. 45–70. DOI: 10.5772/intechopen.69030.
- Staji H., Rassouli M., Jourablou S. Comparative virulotyping and phylogenomics of *Escherichia coli* isolates from urine samples of men and women suffering urinary tract infections. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2019; 22(2):211–4. DOI: 10.22038/ijbms.2018.28360.6880.
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. Rapid and simple deter-

mination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(10):4555–8. DOI: 10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000.

6. Escobar-Páramo P., Grenet K., Le Menac'h A., Rode L., Salgado E., Amorin C., Gouriou S., Picard B., Rahimy M.C., Andremont A., Denamur E., Ruimy R. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(9):5698–700. DOI: 10.1128/AEM.70.9.5698-5700.2004.

7. Tapader R., Basu S., Pal A. Secreted proteases: A new insight in the pathogenesis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2019; 309(3–4):159–168. DOI: 10.1016/j.ijmm.2019.03.002.

8. Yun K.W., Kim D.S., Kim W., Lim I.S. Molecular typing of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Korean children with urinary tract infection. *Korean J. Pediatr.* 2015; 58(1):20–27. DOI: 10.3345/kjp.2015.58.1.20.

9. Momtaz H., Karimian A., Madani M., Safarpour Dehkordi F., Ranjbar R., Sarshar M., Souod N. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2013; 12:8. DOI: 10.1186/1476-0711-12-8.

10. Khairy R.M., Mohamed E.S., Abdel Ghany H.M., Abdelrahim S.S. Phylogenic classification and virulence genes profiles of uropathogenic *E. coli* and diarrhegenic *E. coli* strains isolated from community acquired infections. *PLoS One.* 2019; 14(9):e0222441. DOI: 10.1371/journal.pone.0222441.

11. Ali I., Rifaqat Z., Ahmed I., Tariq F., Graham S.E., Salzman E., Foxman B., Dasti J.I. Phylogeny, sequence-typing and virulence profile of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains from Pakistan. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1):620. DOI: 10.1186/s12879-019-4258-y.

12. Asadi Karam M.R., Habibi M., Bouzari S. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Immunol.* 2019; 108:56–67. DOI: 10.1016/j.molimm.2019.02.007.

13. Lühje P., Brauner A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv. Microb. Physiol.* 2014; 65:337–72. DOI: 10.1016/bs.amphs.2014.08.006.

14. Subashchandrabose S., Mobley H.L.T. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 2015; 3(4):10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012. DOI: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012.

15. Sarowska J., Futoma-Koloch B., Jama-Kmiecik A., Frej-Madrzak M., Ksiaczyc M., Bugla-Ploskonska G., Chorosz-Krol I. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog.* 2019; 11:10. DOI: 10.1186/s13099-019-0290-0.

### Authors:

Kazantsev A.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”; 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation; e-mail: rus-rapi@microbe.ru. V.I. Razumovsky Saratov State Medical University; 112, Bolshaya Kazachya St., Saratov, 410012, Russian Federation; e-mail: meduniv@sgmu.ru.

Osina N.A., Devdariani Z.L. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rus-rapi@microbe.ru.

Mikero A.N. V.I. Razumovsky Saratov State Medical University; 112, Bolshaya Kazachya St., Saratov, 410012, Russian Federation. E-mail: meduniv@sgmu.ru.

Glinkskaya T.O., Kosheleva O.N., Maksimov Yu.V. Saratov City Clinical Hospital No 8. Saratov, Russian Federation.

### Об авторах:

Казанцев А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»; Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46; e-mail: rus-rapi@microbe.ru. Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского; Российская Федерация, 410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112; e-mail: meduniv@sgmu.ru.

Осина Н.А., Девдариани З.Л. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rus-rapi@microbe.ru.

Микеров А.Н. Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского. Российская Федерация, 410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112. E-mail: meduniv@sgmu.ru.

Глинская Т.О., Кошелева О.Н., Максимов Ю.В. Саратовская городская клиническая больница № 8. Российская Федерация, Саратов.

Поступила 09.12.19.

Отправлена на доработку 12.12.19.

Принята к публ. 20.12.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-61-66

УДК 616.98:579.842.23

Л.М. Куклева, И.В. Тучков, Е.Г. Оглодин, З.Л. Девдариани, О.А. Морозов, О.С. Кузнецов,  
В.Г. Германчук, Г.А. Ерошенко

## ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММА *YERSINIA PESTIS*, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК GFP, И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

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

**Цель** работы – конструирование рекомбинантного штамма *Y. pestis*, продуцирующего флуоресцентный белок GFP, и анализ перспектив его использования для изучения взаимодействия возбудителя с простейшими, а также с макроорганизмом млекопитающих (грызунов). **Материалы и методы.** Для создания штамма, продуцирующего флуоресцентный белок GFP, использовали природный штамм *Yersinia pestis*, выделенный в 2016 г. в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы. Ген флуоресцентного белка был введен в составе коммерческого вектора pTurboGFP-B методом электропорации. Свойства полученного рекомбинантного штамма *Y. pestis* 367 pTurbo-GFP-B исследовали с помощью микробиологических, биологических и молекулярно-генетических методов. **Результаты и обсуждение.** Методом электропорации получен штамм возбудителя чумы, содержащий векторную плазмиду pTurboGFP-B, которая кодирует синтез зеленого флуоресцирующего белка GFP, и имеющий устойчивость к антибиотику ампициллину. Сконструированный штамм *Y. pestis*, продуцирующий зеленый флуоресцентный белок, по своим культурально-морфологическим, биохимическим свойствам, вирулентности и выживаемости в смешанной культуре с акантамебами *Acanthamoeba castellanii* не отличался от исходного. На плотных питательных средах рекомбинантный штамм и его субкультуры, полученные от зараженных животных, формировали колонии желто-зеленого цвета, флуоресцирующие при УФ-облучении. В препаратах, полученных от животных и из со-культур с амебами, наблюдали флуоресцирующие клетки возбудителя чумы. Созданный штамм можно использовать в качестве модельного для изучения в лабораторных условиях взаимоотношений возбудителя чумы с клетками простейших (почвенные амебы, нематоды) и млекопитающих.

**Ключевые слова:** возбудитель чумы, рекомбинантный биофлуоресцентный штамм, плазида pTurboGFP-B.

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

Для цитирования: Куклева Л.М., Тучков И.В., Оглодин Е.Г., Девдариани З.Л., Морозов О.А., Кузнецов О.С., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А. Получение штамма *Yersinia pestis*, продуцирующего флуоресцентный белок GFP, и перспективы его использования. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:61–66. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-61-66

L.M. Kukleva, I.V. Tuchkov, E.G. Oglodin, Z.L. Devdariani, O.A. Morozov, O.S. Kuznetsov,  
V.G. Germanchuk, G.A. Eroshenko

## Construction of *Yersinia pestis* Strain Producing Fluorescent Protein GFP and Prospects of Its Usage

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

**Abstract. Objective** of the study was to construct the recombinant *Y. pestis* strain producing fluorescent protein GFP and analysis of the prospects of its usage for investigation of interaction of the agent with the protozoa, and also macroorganism of mammals (rodents). **Materials and methods.** To create the strain producing fluorescent protein GFP, we used the natural *Y. pestis* strain isolated in 2016 in Gorno-Altai high-mountain plague focus. Fluorescent protein gen was inserted into commercial vector pTurboGFP-B via electroporation. Properties of the obtained recombinant *Y. pestis* strain 367 pTurboGFP-B were studied using microbiological, biological, and molecular-genetic methods. **Results and conclusions.** The plague agent strain, containing vector plasmid pTurboGFP-B which encodes synthesis of green fluorescent protein GFP, and being resistant to ampicillin was constructed applying electroporation. The designed *Y. pestis* strain, producing green fluorescent protein, does not differ from the stock strain by its cultural-morphological, biochemical properties, virulence and survivability in mixed culture with *Acanthamoeba castellanii*. On solid nutrient media, recombinant strain and its subcultures, obtained from infected animals, formed colonies of greenish-yellow color, becoming fluorescent under UV-light. In preparations from animals and from co-cultures with amoeba, fluorescent cells of plague agent were observed. The constructed strain can be utilized as a model one for investigation of interactions between plague agent and cells of protozoa (soil amoeba, nematodes) and mammals under laboratory conditions.

**Keywords:** plague agent, recombinant bio-fluorescent strain, plasmid pTurboGFP-B.

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

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

Citation: Kukleva L.M., Tuchkov I.V., Oglodin E.G., Devdariani Z.L., Morozov O.A., Kuznetsov O.S., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A. Construction of *Yersinia pestis* Strain Producing Fluorescent Protein GFP and Prospects of Its Usage. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:61–66. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-61-66

Received 04.03.19. Revised 14.05.19. Accepted 23.05.19.

На территории Российской Федерации и сопредельных государств находится 45 природных очагов чумы, расположенных в различных географических зонах. Естественными носителями чумы в природе являются свыше 200 видов млекопитающих, а переносчиками – более 150 видов блох [1].

По классическим представлениям, чума в природе существует как сложная паразитарная система взаимодействующих популяций возбудителя чумы, теплокровных носителей (грызунов, зайцеобразных, хищников и др.) и членистоногих переносчиков. Основным механизмом природной очаговости чумы считают непрерывное пассирование возбудителя блохами от грызуна к грызуну. Однако к настоящему времени накоплено большое количество фактов, позволяющих предположить, что трансмиссия не является основным механизмом энзоотии чумы [2]. С позиций горизонтальной трансмиссии невозможно объяснить целый ряд особенностей эпизоотического процесса при чуме – наличие длительных межэпизоотических периодов в очагах, «взрывное» начало эпизоотий после многолетних перерывов, возобновление активности очагов после глубоких депрессий численности носителей или смены основных носителей чумы. Очевидно, существует другой, более эффективный способ сохранения *Yersinia pestis* вне теплокровного хозяина, который обеспечивает его длительное сохранение в природном биоценозе очагов чумы [2, 3].

Существенным вкладом в решение проблемы энзоотии чумы стало выявление у возбудителя чумы способности к образованию биопленки – сообщества клеток, окруженных внеклеточным матриксом [4, 5]. Биопленка *Y. pestis* может способствовать длительному сохранению возбудителя во внешней среде [6]. Существует вероятность сохранения возбудителя чумы в членах почвенных биоценозов. На модели возбудителя показано, что выделенные из почвы цистообразующие амебы способны фагоцитировать клетки *Y. pestis*. В экспериментальных условиях установлена возможность длительного сохранения штаммов основного подвида в ассоциации с почвенными амебами *Acanthamoeba* sp. и слизевиками *Dictyostelium discoideum* [7, 8].

Недавно сформулирована гипотеза вертикальной трансмиссии, согласно которой в длительном сохранении и последующем выносе возбудителя чумы в популяцию грызунов зараженными личинками блох участвуют члены почвенных биоценозов очагов чумы – простейшие и нематоды [3, 8]. Для подтверждения этой гипотезы необходимы убедительные экспериментальные доказательства, однако при изучении взаимоотношений возбудителя чумы с членами природных биотопов возникают методические трудности, связанные с отсутствием у штаммов *Y. pestis* легко детектируемых маркеров.

В последние годы для облегчения мониторинга и выявления микроорганизмов широко используют методы молекулярной визуализации, главным эле-

ментом которых является применение специальных инертных контрастных макромолекул, которые не нарушают процессов жизнедеятельности клетки и не приводят к фатальным биологическим изменениям [9]. В настоящее время в качестве удобных и эффективных прижизненных маркеров микроорганизмов используют различные флуоресцентные белки.

Впервые зеленый флуоресцирующий белок – GFP (от англ. green fluorescent protein) обнаружен у медузы *Aequorea victoria* [10]. Затем была определена структура белка, клонирован кодирующий его ген и показана экспрессия белка в различных прокариотических и эукариотических организмах [9]. Сейчас известно несколько десятков природных и модифицированных генов, белковые продукты которых дают излучение практически во всех участках видимого спектра, от сине-зеленого до рубиново-красного.

Белок GFP обладает рядом свойств, которые обуславливают его широкое использование в качестве биологического маркера. Он состоит из 232 аминокислот, молекулярная масса – 26 кДа; характеризуется двумя пиками поглощения при длинах волн 395 и 475 нм и пиком флуоресценции при 498 нм. Белок принимает нативную конфигурацию и образует флуорофор без участия каких-либо внешних ферментов и кофакторов, обладает низкой метаболической токсичностью. Флуоресценция, обусловленная GFP, стабильна даже в присутствии денатурирующих агентов в широком диапазоне pH, сигнал продолжителен во времени, отсутствует фоновая флуоресценция [9, 10].

В последние годы флуоресцентный белок GFP в качестве биосенсора успешно применяли на широком круге хозяев для установления внутриклеточной локализации и динамики белков, изучения механизмов экспрессии генов, распространения бактерий в организме животных, иммунных реакций, межбактериального взаимодействия в смешанных культурах [11–13].

Основными методами флуоресцентного маркирования бактерий являются введение гена флуоресцентного белка в составе плазмиды и встраивание маркерного гена в хромосому при помощи транспозона. Использование плазмид для маркирования бактерий имеет целый ряд преимуществ ввиду их многокопийности и интенсивности экспрессии белка. В последнее время для получения флуоресцентно-меченных штаммов часто используют плазмиду pTurboGFP-B. Множественная копия этой плазмиды повышает скорость накопления маркерного белка и интенсивность его флуоресценции. Плазида pTurboGFP-B содержит ген модифицированного варианта белка GFP, клонированный из веслоногих ракообразных – копеподы *Pontellina plumata* [14]. Белок обладает яркой зеленой флуоресценцией (максимум поглощения/испускания – 482/502 нм), характеризуется высокой скоростью синтеза в широком диапазоне температур, фотостабильностью, не токсичен для клеток, стабильно в них сохраняется.

**Цель** настоящего исследования состояла в конструировании рекомбинантного штамма *Y. pestis*, продуцирующего флуоресцентный белок GFP, и анализе перспектив его использования для изучения взаимодействия возбудителя с простейшими, а также с макроорганизмом млекопитающих (грызунов).

### Материалы и методы

В работе в качестве реципиента использовали штамм *Yersinia pestis* 367, выделенный в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы в 2016 г. Бактерии культивировали на агаре и в бульоне LB при температуре 28 °С в течение 18 ч. В качестве селективного антибиотика для выращивания рекомбинантного штамма использовали ампициллин (50 мг/мл).

Для введения в клетки возбудителя чумы флуоресцентного белка GFP использовали коммерческую плазмиду pTurboGFP-B («Evrogen», Россия). Эта плазида размером 4,1 тпн содержит ген белка GFP, точку начала репликации плазмиды ColE1 и ген β-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину. Эксперименты проводили в соответствии с санитарными правилами «Безопасность работы с рекомбинантными молекулами ДНК».

Подготовку компетентных клеток и электропорацию выполняли в соответствии с рекомендациями R. Conchas *et al.* [15]. Клетки штамма *Y. pestis* 367 трансформировали в системе Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, США) в следующих условиях: напряжение – 3 кВ, фиксированная емкость – 25 мкФ, сопротивление – 200 Ом. Эффективность трансформации определяли, высевая десятикратные разведения взвеси полученного штамма на пластинки агара LB с 50 мкг/мл ампициллина. Просмотр колоний осуществляли визуально.

Зеленое флуоресцентное свечение бактерий выявляли при помощи флуоресцентного микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, ФРГ). Для детекции GFP использовали набор светофильтров № 10 (полоса возбуждения BP 450–490, испускания BP 515–565).

Видовые и дифференциально-диагностические признаки рекомбинантного штамма возбудителя чумы *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B определяли в соответствии с рекомендациями, изложенными в практическом руководстве [16]. Плазмидный состав штаммов изучали по методу S. Kado *et al.* [17]. Вирулентность исходного и рекомбинантного штамма определяли в тестах *in vitro* и *in vivo*. Вирулентность *in vitro* оценивали по признакам наличия зависимости от ионов кальция при 37 °С и сорбции красителей. Вирулентность *in vivo* определяли на беспородных белых мышах (18–20 г). Биомодели содержали в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Животных заражали подкожно испытуемыми штаммами в дозах  $1 \cdot 10^3$  и  $1 \cdot 10^4$  КОЕ/мл. Павших мышей вскрывали, делали мазки и посеы отпечат-

ков органов на плотные среды. Мазки-отпечатки от павших животных просматривали в микроскопе Axio Imager Z2 (Carl Zeiss) с объективом Plan Apjromat 150/1,35 DIC Glic Korr VIS-IR при увеличении  $\times 1500$ . Фотографии получали с помощью камеры Axio503 Color (Carl Zeiss).

Взаимодействие с простейшими изучали на модели амёб *Acanthamoeba castellanii*, выделенных из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы в 2016 г. по ранее использованному методу [7]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартных методов и программ [18].

### Результаты и обсуждение

Для конструирования штамма возбудителя чумы, продуцирующего зеленый флуоресцентный белок GFP, в качестве реципиента использовали природный штамм *Y. pestis* 367, выделенный в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы от сурка (*Marmota baibacina*) в 2016 г. Штамм относится к основному подвиду, античному биовару, филогенетической линии 4.ANT, которая циркулирует в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы. Для штаммов линии 4.ANT характерно наличие дополнительной плазмиды pTP33 размером 33,8 тпн [19]. Методом электропорации сконструирован рекомбинантный штамм, получивший обозначение *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B. Эффективность трансформации составила  $2 \cdot 10^8$  трансформантов/мкг ДНК. Клетки *Y. pestis*, несущие ген зеленого флуоресцентного белка, после процедуры трансформации выявляли по наличию зеленого флуоресцентного свечения бактерий.

Проведено сравнение культурально-морфологических и биохимических свойств исходного и рекомбинантного штаммов *Y. pestis*. Установлено, что рекомбинантный штамм *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B обладал типичными для возбудителя чумы морфологией клеток, агглютинативным ростом в жидких питательных средах. На плотных питательных средах рекомбинантный штамм *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B формировал колонии желто-зеленого цвета, хотя структура колоний обоих штаммов не отличалась. Оба штамма характеризовались чувствительностью к диагностическим бактериофагам – псевдотуберкулезному, чумному Покровской и Л413 «С».

На основании проведенного изучения биохимических признаков установлено, что рекомбинантный штамм *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B по своим признакам не отличался от исходного. Оба штамма ферментировали глицерин, арабинозу, глюкозу, обладали денитрифицирующей активностью, не разлагали рамнозу и мелибиозу. По комплексу признаков, полученный штамм, как и исходный, относится к античному биовару основного подвида *Y. pestis*. Таким образом, введение в реципиентный штамм векторной плазмиды pTurboGFP-B не привело к изменению его свойств.

Для подтверждения присутствия векторной плазмиды в штамме *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B определяли плазмидный состав исходного и рекомбинантного штаммов (рис. 1).

Представленные на рис. 1 данные свидетельствуют о наличии у штаммов *Y. pestis* 367 и *Y. pestis* 367 pTurbo GFP-B трех резидентных плазмид возбудителя чумы – pFra (96,2 тпн), pCad (70,3 тпн) и pPst (9,6 тпн). Кроме того, в обоих штаммах выявлена плазида pTP33 (33,8 тпн), наличие которой характерно для штаммов возбудителя чумы линии 4.ANT [1]. В рекомбинантном штамме присутствует также векторная плазида pTurboGFP-B (4,1 kb).

Вирулентность рекомбинантного штамма *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B *in vitro* определяли по наличию зависимости роста от присутствия в среде ионов кальция при 37 °С и способности к пигментсорбции [16]. Установлено наличие признака зависимости роста от ионов Ca<sup>2+</sup> в условиях 37 °С у обоих изученных штаммов. Популяции обоих штаммов на 95 % состояли из Ca<sup>2+</sup>-зависимых клеток. Способность к сорбции пигмента на среде LB, содержащей краситель Конго красный, выявлена как у исходного, так и у рекомбинантного штаммов возбудителя чумы. Клетки, сорбирующие краситель, составляли 90–95 % от общего количества клеток в популяции. Таким образом, введение рекомбинантной плазмиды в штамм *Y. pestis* 367 не изменило признаки, ассоциируемые с вирулентностью этого возбудителя.

Для оценки вирулентности рекомбинантного штамма *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B *in vivo* проведено подкожное заражение белых мышей исходным и рекомбинантным штаммами в дозах 1·10<sup>3</sup> и 1·10<sup>4</sup> КОЕ/мл. В результате установлено, что оба

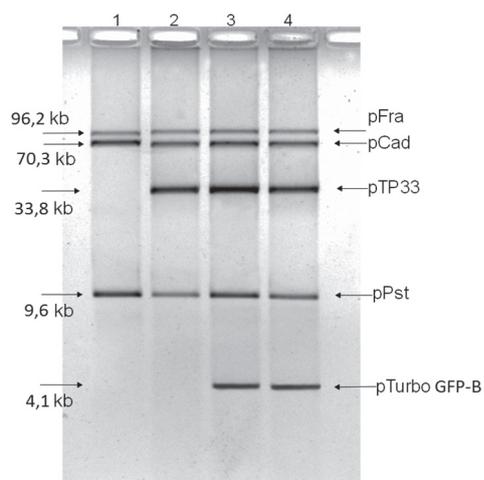


Рис. 1. Плазмидный состав исходного *Y. pestis* 367 и рекомбинантного *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B штаммов:

Штаммы *Y. pestis*: 1 – EV NIIIEG; 2 – 367; 3 – 367 pTurboGFP-B; 4 – 367 pTurbo GFP-B (получен от зараженных животных)

Fig. 1. Plasmid composition of the stock *Y. pestis* 367 and recombinant *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B strains:

*Y. pestis* strains: 1 – EV NIIIEG; 2 – 367; 3 – 367 pTurboGFP-B; 4 – 367 pTurbo GFP-B (obtained from infected animals)

штамма вызывали гибель животных в использованных дозах. Средний срок жизни зараженных животных составил (5,3±0,47) сут (для исходного штамма) и (5,5±0,50) сут (для рекомбинантного штамма). Выявленные различия статистически недостоверны (критерий достоверности разницы –  $t_d < 12,7$ ). У павших животных выявлена типичная патологоанатомическая картина чумы. Флуоресцирующие клетки штамма *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B высевали из всех органов (регионарные лимфоузлы, печень, селезенка) и крови. Наибольшую обсемененность наблюдали в печени и селезенке (рис. 2, А, Б). В мазках-отпечатках органов погибших животных обнаружены бактериальные клетки, обладающие зеленой флуоресценцией. Клетки рекомбинантного штамма четко визуализировались в отпечатках ввиду отсутствия фонового свечения.

Изучена возможность использования сконструированного штамма *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B в исследованиях по изучению экологии возбудителя чумы, в частности в изучении взаимодействия с простейшими из почвенных биоценозов природных очагов. Для совместного культивирования использовали аксенические культуры акантамеб *A. castellani*, выделенные на эпизоотических участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Таким образом, проведено моделирование выживаемости штамма *Y. pestis* в простейших, к которым был адаптирован исходный штамм 367, поскольку этот штамм и амёбы выделены в одних и тех же участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

В результате установлено, что рекомбинантный штамм сохраняется в клетках амёб при температуре 26 °С и влажности 20 % в течение всего срока эксперимента (21 день). При этом клетки рекомбинантного штамма четко визуализировались в люминесцентном микроскопе Axio Imager Z2 (Carl Zeiss) в виде биполяров, типичной формы возбудителя чумы (рис. 2, В).

Таким образом, с помощью метода электропорации нами сконструирован рекомбинантный биофлуоресцентный штамм *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B с векторной плазмидой pTurboGFP-B, детерминирующей синтез зеленого флуоресцирующего белка GFP. Эффективность трансформации была высокой и составила 2·10<sup>8</sup> трансформантов/мкг ДНК векторной плазмиды. Введение реципиентной плазмиды не приводило к изменению видовых и биохимических признаков исходного штамма, его вирулентности, выживаемости в смешанной культуре с акантамебами *A. castellani*. Клетки рекомбинантного штамма на плотной среде формировали колонии с зеленой флуоресценцией, которую можно наблюдать невооруженным глазом при естественном освещении. В препаратах (мазки-отпечатки органов животных, павших от заражения рекомбинантным штаммом, а также мазки со-культур с амёбами) с использованием люминесцентного микроскопа Axio Imager Z2 четко визуализировались флуоресцирующие би-

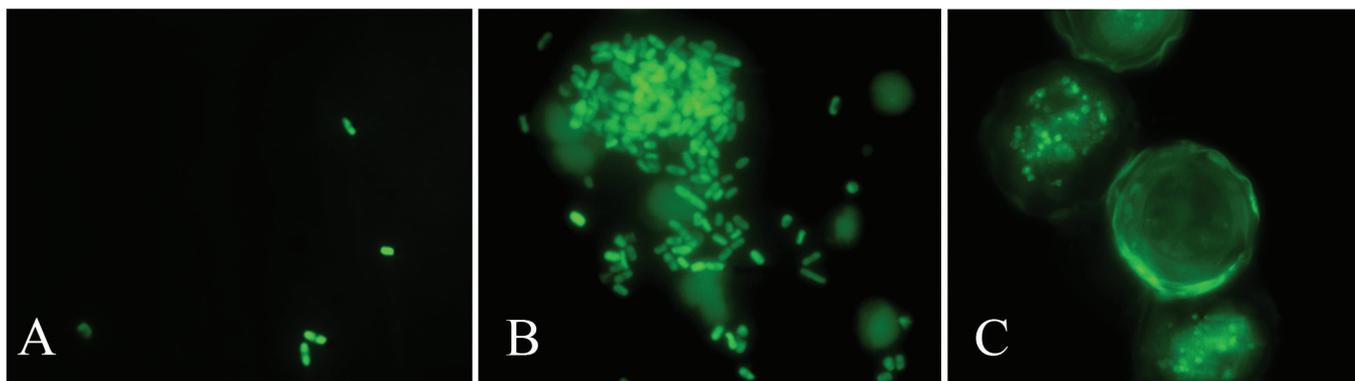


Рис. 2. Выявление флуоресценции клеток штамма *Y. pestis* pTurbo GFP-B в экспериментах по заражению белых мышей и совместному культивированию с амебами *A. castellanii*:

*A* – в мазках крови белых мышей, павших от чумы; *B* – в мазках-отпечатках селезенки; *C* – в мазках со-культур с амебами *A. castellanii*. Микроскоп флуоресцентный Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, ФРГ). Эмиссия при длине волны 502 нм. Увеличение  $\times 1500$

Fig. 2. Detection of fluorescent cells of *Y. pestis* pTurbo GFP-B strain in experiments on infection of white mice and co-culture with amoeba *A. castellanii*:

*A* – in blood smears of white mice that died of plague; *B* – in spleen tissue/touch-smears; *C* – in smears of co-cultures with amoeba *A. castellanii*. Fluorescent microscope Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Federal Republic of Germany). Emission at wave-length of 502 nm. Magnification –  $\times 1500$

поляры, типичной для возбудителя чумы формы. Преимуществом использования штаммов *Y. pestis* с плазмидой pTurboGFP-B является кодируемая плазмидой устойчивость к антибиотику ампициллину, что облегчает селекцию клеток этого штамма из смешанных культур или при высеве из органов павших животных.

Изучение флуоресцирующих белков – их клонирование, определение структуры и возможности экспрессии кодирующих их генов в различных про- и эукариотических организмах – обеспечило исследователей надежными прижизненными маркерами для изучения живых клеток. Благодаря использованию флуоресцирующих белков стало возможным визуализировать процессы, происходящие при развитии инфекционного процесса в макроорганизме, оценивать выживаемость и конкурентноспособность бактерий во внешней среде. Широкое применение нашло использование зеленого флуоресцентного белка GFP.

Однако использованию зеленого флуоресцентного белка для изучения патогенных иерсиний посвящены единичные работы. Так, E. Gensberger *et al.* [12] получили штаммы *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, меченные белком GFP, и отметили отсутствие влияния этого белка на ростовые характеристики использованных штаммов. Проведено изучение вирулентности штаммов *Y. pestis* со встроенным в хромосому геном белка GFP [13]. Показано преимущество использования маркированных GFP штаммов при скрининге бактерий внутри макрофагов [11, 13], продемонстрирован новый подход к характеристике детерминант вирулентности возбудителя чумы. Авторы количественно оценивали синтез факторов вирулентности возбудителя чумы, используя плазмиду, в которой экспрессия GFP, находилась под контролем промоторов YOP белков, входящих в систему секреции 3 типа [11]. Однако нами впервые

получен штамм *Y. pestis*, продуцирующий зеленый флуоресцентный белок GFP, на основе природного штамма, выделенного в Горно-Алтайском природном очаге в современный период. Проведены изучение распространения этого штамма в организме лабораторных животных. Показаны преимущества использования флуоресцентного штамма для изучения взаимодействия *Y. pestis* с массовыми членами почвенных биоценозов (простейшие, слизевики). Этот штамм найдет применение для изучения в лабораторных условиях механизмов персистенции возбудителя чумы в природных биоценозах очагов чумы, а также для исследования особенностей патогенеза этой инфекции.

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

#### Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 191 с.
2. Солдаткин И.С., Руденчик Ю.В., Ефимов С.В. Эпизоотический процесс в природных очагах чумы (обзор данных и ревизия концепции). В кн.: Эйгелис Ю.К., редактор. Вопросы паразитологии и неспецифической профилактики зоонозов. Саратов; 1988. С. 83–134.
3. Попов Н.В., Слудский А.А., Удовиков А.И., Аникин В.В., Яковлев С.А., Караваева Т.Б. К роли нематод (*Secernentea, Rhabdidae*) – паразитов блох в энзоотии чумы. *Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье*. 2006; 5:88–92.
4. Darby C. Uniquely insidious: *Yersinia pestis* biofilms. *Trends Microbiol.* 2008; 16(4):158–64. DOI: 10.1016/j.tim.2008.01.005.
5. Hinnebusch B., Erickson D. *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 322:229–48. DOI: 10.1007/978-3-540-75418-3\_11.
6. Hall-Stoodley L., Costerton J., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2(2):95–108. DOI: 10.1038/nrmicro821.
7. Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Широков А.А., Буров А.М., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Оценка длительности сохранения штаммов *Yersinia pestis* в клетках почвенных амеб *Acanthamoeba* sp. в экспериментальных условиях. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 2:69–74.

DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74.

8. Никульшин С. В., Онацкая Т. Г., Луканина Л. М. Изучение ассоциации почвенных амёб *Hartmannella rhyssodes* с бактериями – возбудителями чумы и псевдотуберкулеза в эксперименте. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1992; 69(9–10):2–4.

9. Zhang X., Cui Z., Wang D. Sensing of biomolecular interactions using fluorescence complementing systems in living cells. *Biosens. Bioelectron*. 2016; 76:243–50. DOI: 10.1016/j.bios.2015.07.069.

10. Sarcar P., Chattopadhyay A. GFP fluorescence: A few lesser-known nuggets that make it work. *J. Biosci*. 2018; 43(3):421–30. DOI: 10.1007/s12038-018-9779-9.

11. Forde C., Rocco J., Fitch J., McCutchen-Maloney S. Real-time characterization of virulence factor expression in *Yersinia pestis* using a GFP reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004; 324(2):795–800. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.08.236.

12. Gensberger E., Kostić T. Green fluorescent protein labeling of food pathogens *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Microbiol. Meth*. 2017; 132:21–6. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.11.008.

13. Su S., Bangar H., Saldanha R., Pemberton A., Aronow B., Dean G., Lamkin T., Hassett D.J. Construction and characterization of stable, constitutively expressed, chromosomal green and red fluorescent transcriptional fusions in the select agents, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *MicrobiologyOpen*. 2014; 3(5):610–29. DOI: 10.1002/mbo3.192.

14. Shagin D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Labas Y.A., Semenova T.N., Ugalde J.A., Meyers A., Nunez J.M., Widder E.A., Lukyanov S.A., Matz M.V. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol. Biol. Evol*. 2004; 21(5):841–50. DOI: 10.1093/molbev/msh079.

15. Conchas R.F., Carniel E. A highly efficient electroporation system for transformation of *Yersinia*. *Gene*. 1990; 87(1):133–7. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90505-L.

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

17. Kado C., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol*. 1981; 145(3):1365–73. PMID: 7009583. PMID: PMC217141.

18. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд-во МГУ; 1970. 367 с.

19. Балахонov С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остяк А.С., Витязева С.А., Корзун В.М., Верзхутский Д.Б., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Ивченко Н.И., Рождественский Е.Н., Висков Е.Н., Фомина Л.А. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение I. 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.

## References

1. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian-Sea Region, Central Asia and Siberia]. Moscow: “Meditsina”; 2005. 192 p.

2. Soldatkin I.S., Rudenchik Yu.V., Efimov S.V. [Epizootic process in the natural foci of plague (the review of data and audit of the concept)]. In: [Issues of Parasitology and Non-Specific Prevention of zoonoses]. Saratov; 1988. P. 83–134.

3. Popov N.V., Sludsky A.A., Udovikov A.I., Anikin V.V., Yakovlev S.A., Karavaeva T.B. [Concerning the role of nematodes (*Secernentea, Rhabdidae*) – flea parasites in plague enzootics]. *Entomologicheskie i Parazitologicheskie Issledovaniya v Povolzhie* [Entomological and Parasitological Studies in Volga River Basin]. 2006; 5:88–92.

4. Darby C. Uniquely insidious: *Yersinia pestis* biofilms. *Trends Microbiol*. 2008; 16(4):158–64. DOI: 10.1016/j.tim.2008.01.005.

5. Hinnebusch B., Erickson D. *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2008; 322:229–48. DOI: 10.1007/978-3-540-75418-3\_11.

6. Hall-Stoodley L., Costerton J., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol*. 2004; 2(2):95–108. DOI: 10.1038/nrmicro821.

7. Koshel’ E.I., Eroshenko G.A., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Shirokov A.A., Burov A.M., Kuznetsov O.S., Kuttyrev V.V. [Exploratory study of the long-term persistence of *Yersinia pestis* in the cells of soil-inhabiting amoeba – *Acanthamoeba* Sp.] *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 2:69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74.

8. Nikul’shin S.V., Onatskaya T.G., Lukanina L.M. [Associations of the soil amoeba *Hartmannella rhyssodes* with the bacterial causative agents of plague and pseudotuberculosis in an experiment]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology]. 1992; 9–10:2–5.

9. Zhang X., Cui Z., Wang D. Sensing of biomolecular interactions using fluorescence complementing systems in living cells. *Biosens. Bioelectron*. 2016; 76:243–50. DOI: 10.1016/j.bios.2015.07.069.

10. Sarcar P., Chattopadhyay A. GFP fluorescence: A few lesser-known nuggets that make it work. *J. Biosci*. 2018; 43(3):421–30. DOI: 10.1007/s12038-018-9779-9.

11. Forde C., Rocco J., Fitch J., McCutchen-Maloney S. Real-time characterization of virulence factor expression in *Yersinia pestis* using a GFP reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004; 324(2):795–800. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.08.236.

12. Gensberger E., Kostić T. Green fluorescent protein labeling of food pathogens *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Microbiol. Meth*. 2017; 132:21–6. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.11.008.

13. Su S., Bangar H., Saldanha R., Pemberton A., Aronow B., Dean G., Lamkin T., Hassett D.J. Construction and characterization of stable, constitutively expressed, chromosomal green and red fluorescent transcriptional fusions in the select agents, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *MicrobiologyOpen*. 2014; 3(5):610–29. DOI: 10.1002/mbo3.192.

14. Shagin D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Labas Y.A., Semenova T.N., Ugalde J.A., Meyers A., Nunez J.M., Widder E.A., Lukyanov S.A., Matz M.V. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol. Biol. Evol*. 2004; 21(5):841–50. DOI: 10.1093/molbev/msh079.

15. Conchas R.F., Carniel E. A highly efficient electroporation system for transformation of *Yersinia*. *Gene*. 1990; 87(1):133–7. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90505-L.

16. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases: Practice Guidelines]. Moscow: “Shiko”; 2013. 560 p.

17. Kado C., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol*. 1981; 145(3):1365–73. PMID: 7009583. PMID: PMC217141.

18. Plokhinsky N.A. Biometrics. Moscow: MSU Publishing House; 1970. 367 p.

19. Balakhonov S.V., Afanas’ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vitязeva S.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Ivchenko N.I., Rozhdstvensky 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.

## Authors:

Kukleva L.M., Tuchkov I.V., Oglodin E.G., Devdariani Z.L., Morozov O.A., Kuznetsov O.S., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

## Об авторах:

Куклева Л.М., Тучков И.В., Оглодин Е.Г., Девдариани З.Л., Морозов О.А., Кузнецов О.С., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 04.03.19.

Отправлена на доработку 14.05.19.

Принята к публ. 23.05.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-67-72

УДК 616.932:616-07

Л.В. Ларионова, Д.И. Симакова, А.Н. Наркевич, И.В. Архангельская, Г.Г. Шубин

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ДИАГНОСТИКУМА ПОЛИМЕРНОГО ХОЛЕРНОГО АНТИГЕННОГО НА ОСНОВЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 СЕРОГРУППЫ**

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

Представители рода *Vibrio cholerae* отличаются структурой липополисахарида, в частности его О-полисахаридных цепей (О-антиген), определяющей серологическую специфичность вибрионов. В настоящее время для получения препарата липополисахарида используется водно-фенольный метод. Однако данная методика относится к жестким химическим методам, приводит к изменению исходной молекулярной организации биополимера, нарушая его структуру и биологические свойства. Современные технологии при разработке диагностических препаратов для иммуносуппензионной реакции агломерации объемной позволяют получать синтетические носители с различными реакционными группами на поверхности частиц, способными связывать антигены/антитела. **Цель** исследования – создание холерного антигенного диагностикума на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы. **Материалы и методы.** В качестве сенситина использован липополисахарид, полученный с помощью авторской модификации метода ферментативной очистки из клеточных оболочек холерного вибриона с использованием ультразвуковой дезинтеграции. **Результаты и обсуждение.** Полученный сенситин содержит небольшие примеси белка (1,5 %) и нуклеиновых кислот (0,1 %). Диагностический препарат характеризуется высокой аналитической чувствительностью в реакции агломерации объемной с холерными коммерческими и экспериментальными кроличьими сыворотками к *Vibrio cholerae* O1 серогруппы (1:640 – 1:5120) и аналитической специфичностью (диагностикум не взаимодействует с гетерологичными сыворотками, с сыворотками к возбудителям острых кишечных инфекций, а также с сыворотками здоровых доноров). Сконструирован диагностикум полимерный холерный антигенный, предназначенный для выявления антител к холерному липополисахариду в сыворотках крови больных, переболевших, подозрительных на заболевание или вакцинированных людей.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, липополисахарид, полимерные микросферы, диагностикум, аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность.

Корреспондирующий автор: Ларионова Людмила Владимировна, e-mail: plague@aaanet.ru.

Для цитирования: Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Наркевич А.Н., Архангельская И.В., Шубин Г.Г. Конструирование диагностикума полимерного холерного антигенного на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:67–72. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-67-72

L.V. Larionova, D.I. Simakova, A.N. Narkevich, I.V. Arkhangel'skaya, G.G. Shubin

**Construction of Polymeric Antigenic Diagnosticum Based on *Vibrio cholerae* O1 Lipopolysaccharide**

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

**Abstract.** Representatives of the genus *Vibrio cholerae* differ in the structure of lipopolysaccharide, in particular, its O-polysaccharide chains (O-antigen), which determines the serological specificity of vibrios. Currently, the water-phenolic method is used to obtain the lipopolysaccharide preparation. However, this technique relates to harsh chemical methods, leads to a change in original molecular organization of biopolymer, violating its structure and biological properties. Modern technologies in the development of diagnostic kits for the immuno-suspension reaction of volume agglomeration allow for obtaining synthetic carriers with different reaction groups on the particle surface capable to bind antigens/antibodies. **The aim** of this study was to construct cholera antigenic polymeric diagnostic kit based on the lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 serogroup. **Materials and methods.** The lipopolysaccharide was used as a sensitizer obtained through the author's modification of enzymatic purification from the cell membranes of *Vibrio cholerae* using ultrasonic disintegration. **Results and discussion.** The resulting sensitin contains small impurities of protein (1.5 %) and nucleic acids (0.1 %). Diagnosticum is characterized by high analytical sensitivity in agglomeration reaction with commercial and experimental rabbit serum to *Vibrio cholerae* O1 serogroup (1:640 – 1:5120) and analytical specificity (the diagnosticum does not interact with heterologous sera, with serums to pathogens of acute intestinal infections, as well as with sera from healthy donors). A polymeric antigenic cholera diagnosticum designed to detect antibodies to lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* in the blood serum of patients who were ill, suspected of the disease or vaccinated people has been constructed.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, lipopolysaccharide, polymeric microspheres, diagnosticum, analytical sensitivity, analytical specificity.

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

Corresponding author: Lydmila V. Larionova, e-mail: plague@aaanet.ru.

Citation: Larionova L.V., Simakova D.I., Narkevich A.N., Arkhangel'skaya I.V., Shubin G.G. Construction of Polymeric Antigenic Diagnosticum Based on *Vibrio cholerae* O1 Lipopolysaccharide. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:67–72. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-67-72

Received 22.07.19. Revised 24.10.19. Accepted 28.11.19.

Совершенствование лабораторной диагностики холеры, в том числе создание новых препаратов, которые позволяют выявлять противохолерные антитела в сыворотках крови больных, подозрительных на заболевание или вакцинированных людей, является одним из перспективных направлений исследования. Известно, что представители вида *Vibrio cholerae* отличаются структурой липополисахарида (ЛПС), а именно его О-полисахаридных цепей (О-антигена), определяющих серологическую специфичность вибрионов. ЛПС является крупным структурным компонентом клеточной оболочки грамотрицательных бактерий (в том числе и холерного вибриона), с его действием на организм связывают объективные клинические проявления интоксикации [1, 2]. В связи с этим актуально создание новых диагностических препаратов для выявления противохолерных антител к липополисахаридам [3, 4].

При исследовании роли ЛПС в патогенезе различных заболеваний важным этапом является его выделение из бактериальной клетки возбудителя. В настоящее время разработаны и предложены различные методики выделения и очистки ЛПС, позволяющие определять его биологическую функцию, химическую структуру и серологическую активность. В литературе приводятся способы выделения ЛПС из бактериальных клеток сальмонелл и псевдомонад [5], а также чумного микроба [6, 7]. Наиболее широкое применение имеет водно-фенольный способ получения ЛПС [8, 9]. Использование фенола в различных вариантах относится к жестким химическим методам выделения эндотоксина и приводит к изменению исходной молекулярной организации биополимера, нарушая его структуру и биологические свойства. При этом необходимо отметить высокую токсичность и химическую агрессивность самого фенола, что является ограничивающим фактором при получении больших количеств ЛПС. Щадящие методы получения ЛПС основаны на предварительном разрушении или лизисе бактерий с последующей депротенинизацией лизата протеазами и нуклеазами.

Для выявления противохолерных антител в сыворотках больных, подозрительных на заболевание холерой, и вакцинированных людей ранее применялись эритроцитарные диагностикумы. Свойства биологических носителей зависят от генетических особенностей и возраста донора, сезона, условий содержания животного и т.д., что обуславливает нестандартность и нестабильность эритроцитарного носителя. На протяжении нескольких лет широко обсуждался вопрос о замене эритроцитарного носителя полимерными латексами. Все большее применение находят реакции с использованием диагностических препаратов на основе полимерных микросфер. Современные технологии позволяют получать синтетические носители различных размеров с реакционными группами на поверхности частиц, способных фиксировать антигены/антитела, что способствует получению стандартных и стабильных диагностических препаратов. Иммуносуппензионная реакция

агломерации объемная (РАО), проводимая при использовании латексных диагностикумов, является доступным и простым в техническом отношении методом, поскольку не требует наличия специального оборудования, является одностадийной реакцией и может быть применена в полевых условиях [10, 11, Приказ Роспотребнадзора № 1116 от 01.12.2017 г. «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней»].

**Цель работы** – конструирование диагностикума полимерного холерного антигенного на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы.

## Материалы и методы

Поликлональные кроличьи сыворотки к культурам *V. cholerae* Classical 1395, *V. cholerae* O139 16064, *V. cholerae* El Tor 2044, *V. cholerae* El Tor 13020 получали по двум схемам. Первая схема включала в себя пять инъекций суточной культуры *V. cholerae*, обеззараженной кипячением в течение 30 мин, с интервалами в 4 сут с увеличивающимися концентрациями (от  $25 \cdot 10^7$  м.к. до  $1 \cdot 10^9$  м.к.). Первая инъекция проводилась внутривенно, последующие – подкожно. Через 7 сут после последней инъекции проверяли титр анти-ЛПС антител и проводили тотальное обескровливание.

Вторая схема включала в себя предварительное подкожное введение «Тактивина» в течение 3 дней в количестве 0,3 мл, на 4 день внутривенно вводили  $25 \cdot 10^7$  м.к. суточной культуры *V. cholerae*, обеззараженной кипячением в течение 2 ч. С 9 по 11 сут подкожно вводили  $25 \cdot 10^7$  м.к. с неполным адьювантом; на 16, 17 и 18 сут –  $50 \cdot 10^7$  м.к. с неполным адьювантом; на 23, 24, 25 сут –  $75 \cdot 10^7$  м.к. с неполным адьювантом; на 30–32 сут –  $1 \cdot 10^9$  м.к. с неполным адьювантом. Через 7 сут после последней инъекции проверяли титр анти-ЛПС антител и проводили забор крови.

Все эксперименты с животными выполнялись в соответствии с законодательством Российской Федерации [Приказ Министерства здравоохранения РФ № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» от 01.04.2016 г., ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организация процедур», ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»] и Директивой европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [Директива 2010/63/EU]. Эксперименты осуществляли в соответствии с СП 1.3.3118-13. Для получения нормальных человеческих сывороток получено информированное согласие.

Для исследования чувствительности и специфичности полученного экспериментального диагностикума использовали коммерческие и экс-

периментальные противохолерные сыворотки. Аналитическую чувствительность оценивали с помощью коммерческих сывороток: сыворотка диагностическая холерная O1 адсорбированная сухая для реакции агглютинации (РА), серия 83, 87 (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), и экспериментальная кроличья противохолерная сыворотка к *V. cholerae* O1 (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт).

Аналитическую специфичность оценивали, используя коммерческие сыворотки: сыворотка диагностическая холерная неO1 группы O139 адсорбированная кроличья для реакции агглютинации (РА) на стекле, серия 86 (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»); «Сыворотка сальмонеллезная адсорбированная O-поливалентная основных групп ABCDE для РА (ПЕТСАЛ®)», серия 04111 (ФГУП СПбНИИВС); «Сыворотка диагностическая шигеллезная адсорбированная поливалентная к *Shigella flexneri* I–VI для РА (АГНОЛЛА®)», серия 69-1113 (ФГУП СПбНИИВС); «Сыворотка диагностическая эшерихиозная ОКА поливалентная сухая для РА», серия 6010214 (ОАО «Биомед»), (ФБУН НИИМЭ им. Пастера); экспериментальные кроличьи сыворотки к *V. cholerae* O139 16064 и *V. cholerae* nonO1/nonO139-O2, *V. cholerae* nonO1/nonO139-O5, *V. cholerae* nonO1/nonO139-O22 (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт), сыворотки крови, полученные от здоровых доноров.

Липополисахарид выделяли по авторской модификации метода R.P. Darveau и R.T.W. Hancock (1983 г.) из клеточных оболочек холерного вибриона с последующей ферментативной очисткой от примесей белков и нуклеиновых кислот. В препарате ЛПС определяли белок по Лоури [12], нуклеиновые кислоты – по Спирину [13]. Электрофорез полученного препарата проводили по методике U.K. Laemmli в 15 % ПААГ-SDS геле [14]. Нагрузка препарата на лунку составляла 1,5 мкг. Для выявления ЛПС гели окрашивали серебром, используя коммерческий набор «Bio-Rad Silver Stain» в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Полиакролеиновый микросферический носитель получали путем синтеза монодисперсных полимерных микросфер с альдегидными группами в условиях одномоментно протекающей анионной и радикальной полимеризации акролеина в водно-щелочной среде. Окрашивание частиц сферической формы размером (1,2±0,1) мкм производили внесением красителя «Тианин» в полимеризационную смесь в процессе синтеза. После полимеризации носитель отмывали дистиллированной водой при температуре 100 °С. В ходе сенсibilизации сферического носителя холерным ЛПС 50 мг отмывали 0,1 М карбонатным буфером pH 9,2 и центрифугировали при 3000 g при комнатной температуре в течение 15 мин. Осадок сфер суспендировали в 8 мл карбонатного буфера pH (9,2±0,1) и нагревали до температуры 60 °С в течение 15 мин на водяной бане. Прогретый препарат ЛПС в ЗФР pH (7,2±0,1) вносили в суспензию носителя, инкубировали при

температуре 60 °С в течение 2 ч на электромагнитной мешалке, помещали в холодильник на 16–18 ч. После холодовой экспозиции к смеси добавляли 1 мл 1 % раствора желатозы; инкубировали в течение 2 ч на электромагнитной мешалке при комнатной температуре; отмывали трижды ЗФР pH (7,2±0,1); затем суспендировали в 4 мл 0,1 % раствора желатозы. В результате проведенных исследований получен диагностиком полимерный холерный антигенный на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы с рабочим разведением 1:7.

Для повышения стабильности свойств и увеличения срока хранения разработанного диагностического препарата подобраны оптимальные условия его лиофилизации.

Жидкий препарат центрифугировали, осадок полимерного диагностикума суспендировали в 3 % желатозо-сахарозной среде высушивания. Перед лиофилизацией проводили предварительное замораживание жидкого диагностического препарата охлаждением в жидком азоте при температуре -196 °С в течение 1–2 мин. Затем флаконы с экспериментальным препаратом выдерживали в низкотемпературном шкафу для глубокого замораживания при температуре -30 °С в течение 16 ч. Лيوфилизацию проводили в аппарате для лиофильного высушивания «POWER DRY PL 900» («Termascientific») при вакуумном подогреве в течение 15 ч. В процессе лиофилизации в камере высушивания автоматически поддерживалось давление 0,067 hPa. Препараты высушивали до конечной температуры в камере высушивания при 22 °С, после этого флаконы закрывали резиновыми пробками, завальцовывали в среде осушенного стерильного воздуха при нормальном атмосферном давлении и хранили в холодильнике при температуре 4 °С.

Перед постановкой РАО лиофилизированную нормальную кроличью сыворотку (НКС) растворяли в 5 мл ЗФР pH (7,2±0,1), получая разведение 1:100. Лيوфилизированный диагностиком суспендировали в 3,5 мл ЗФР, получая разведение 1:7. Контрольную холерную сыворотку, лиофилизированную из разведения 1:10, растворяли в 1 мл ЗФР, получая разведение 1:10.

Для постановки РАО в каждую лунку 96-луночного планшета с «U»-образными лунками для иммунологических реакций вносили 50 мкл НКС в разведении 1:100. Затем в первую лунку каждого ряда вносили 50 мкл исследуемой сыворотки и двукратно титровали до конца ряда. Диагностикум в рабочем разведении вносили в объеме 25 мкл в каждую лунку и оставляли при комнатной температуре. Для контроля спонтанной агглютинации в две лунки вносили 50 мкл НКС и 25 мкл рабочего разведения диагностикума. Учет результатов осуществляли через 2–2,5 ч. За положительный результат принимали цветной голубой агломерат, выстилающий все дно лунки равномерно или агломерат, выстилающий дно лунки с четко очерченными краями. В отрицательных случаях и в контроле образовывалось компактное колечко или точка в центре лунки.

## Результаты и обсуждение

Таблица 1 / Table 1

В ходе исследования получены поликлональные кроличьи сыворотки к культурам *V. cholerae* Classical 1395, *V. cholerae* O139 16064, *V. cholerae* El Tor 2044, *V. cholerae* El Tor 13020, обезвреженными двумя методами – кипячением в течение 30 мин и 2 ч для последующего исследования чувствительности диагностического препарата. Разный температурный режим обезвреживания бактериальных масс перед иммунизацией кроликов может влиять на увеличение титра анти-ЛПС антител, что позволяет выбрать контрольную сыворотку для определения чувствительности разработанного диагностического препарата. Результаты определения титров антител в экспериментальных сыворотках к *V. cholerae* Classical 1395 *V. cholerae* El Tor 13020, *V. cholerae* El Tor 2044, *V. cholerae* O139 16064, полученных по двум различным схемам, в объемной реакции агломерации с соответствующими культурами холерного вибриона отражены в табл. 1.

Результаты исследования сывороток в РАО показали, что время кипячения существенно не влияет на увеличение количества антител.

Лиофилизированный препарат ЛПС, полученный ферментативным методом из клеточных оболочек, представляет собой белые хлопья, при растворении в дистиллированной воде или ЗФР рН (7,2±0,1) образующие гомогенную, слегка опалесцирующую суспензию. При исследовании чистоты препарата показано присутствие небольших примесей белков и нуклеиновых кислот: 1,5 % белка по Лоури и 0,1 % нуклеиновых кислот. Электрофоретическое исследование показало, что препарат ЛПС представлен полосами с молекулярной массой 12–23 кДа.

Для конструирования диагностикума полимерного холерного антигенного на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы сенсibilизировали полимерные микросферы препаратом ЛПС в карбонатном буфере рН 9,2 в дозе 450 мкг на 50 мг сферического носителя.

## Определение титров антител в экспериментальных кроличьих сыворотках

## Determination of antibody titer in experimental rabbit sera

Штамм, к которому получена сыворотка The strain to which the serum is obtained	Титр в РАО Схема 1 The titer in volume agglomeration reaction Scheme 1	Титр в РАО Схема 2 The titer in volume agglomeration reaction Scheme 2
<i>V. cholerae</i> Classical 1395	1:640	1:640
<i>V. cholerae</i> El Tor 13020	1:1280	1:2560
<i>V. cholerae</i> El Tor 2044	1:640	1:640
<i>V. cholerae</i> O139 16064	1:1280	1:2560

При оценке рабочих характеристик разрабатываемого диагностического препарата оценивали аналитическую чувствительность и специфичность. Аналитическая чувствительность представляет собой то минимальное количество антигена, которое можно определить с помощью диагностикума. Аналитическая специфичность отражает способность диагностикума определять специфический антиген в образце [15].

Аналитическую чувствительность и специфичность разработанного диагностического препарата изучали в реакции агломерации объемной (табл. 2). Титры антител в экспериментальных кроличьих сыворотках определены с соответствующими культурами *V. cholerae* Classical 1395, *V. cholerae* El Tor 13020 в объемной реакции агглютинации, титры антител в коммерческих сыворотках диагностических холерных агглютинирующих были указаны в инструкциях по применению.

Результаты исследования аналитической чувствительности сконструированного диагностикума полимерного холерного антигенного на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы показали его высокую чувствительность. Титры антител коммерческих холерных лошадиных и экспериментальных кроличьих сывороток в РАО с представленным диагностикумом составили от 1:640 до 1:5120.

Таблица 2 / Table 2

## Результаты исследования аналитической чувствительности экспериментального диагностикума

## The results of the study of the analytical sensitivity of experimental diagnosticum

Сыворотка Serum	Титр в РА Titer in agglutination reaction	Титр в РАО Titer in volume agglomeration reaction
Коммерческая сыворотка диагностическая холерная O1 адсорбированная сухая для реакции агглютинации (РА) (серия 83) Commercial diagnostic cholera O1 serum, adsorbed, dry, for agglutination reaction (AR) (series 83)	1:800	1:1280
Коммерческая сыворотка диагностическая холерная O1 адсорбированная сухая для реакции агглютинации (РА) (серия 87) Commercial diagnostic cholera O1 serum, adsorbed, dry, for agglutination reaction (AR) (series 87)	1:2000	1:5120
Кроличья экспериментальная сыворотка к <i>V. cholerae</i> O1 13020 Rabbit experimental serum to <i>V. cholerae</i> O1 13020	1:640	1:640
Кроличья экспериментальная сыворотка к <i>V. cholerae</i> O1 Classical 1395 Rabbit experimental serum to <i>V. cholerae</i> O1 Classical 1395	1:640	1:640
Нормальная кроличья сыворотка Normal rabbit serum	-	Отрицательно Negative

Результаты исследования аналитической специфичности диагностикума в РАО представлены в табл. 3.

Показана высокая специфичность разработанного диагностикума. Диагностический препарат не давал положительные реакции в РАО как с коммерческими, так и с экспериментальными кроличьими гетерологичными холерными сыворотками, не реагировал с сыворотками здоровых доноров, а также с сыворотками, предназначенными для диагностики возбудителей острых кишечных инфекций. Установленный титр 1:20 в реакции с сывороткой коммерческой сальмонеллезной адсорбированной О-поливалентной основных групп ABCDE является не специфическим и не влияет на результаты исследований сывороток.

При создании диагностического препарата следующим этапом исследования является расчет диагностической чувствительности и специфичности, позволяющие определить диагностический титр диагностикума [16].

Таким образом, сконструирован диагностикум полимерный холерный антигенный на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы. Препарат липополисахарида выделяли по авторской модификации метода R.P. Darveau и R.E. Hancock (1983 г.) из клеточных оболочек холерного вибриона, используя

ферментативный метод очистки от примесей белков и нуклеиновых кислот. Выделение ЛПС из клеточных оболочек холерного вибриона позволило сократить количество протеиназы, РНКазы, ДНКазы. При исследовании чистоты полученного препарата показано присутствие небольших примесей (1,5 % белка и 0,1 % нуклеиновых кислот). Электрофоретический анализ показал, что препарат ЛПС представлен S-формой с молекулярной массой 12–23 кДа и использован в качестве сенситина. При использовании экспериментальных кроличьих и коммерческих холерных диагностических сывороток установлена аналитическая чувствительность сконструированного препарата в титрах от 1:640 до 1:5120. Специфичность изучали на панели гетерологичных сывороток, а также сывороток здоровых доноров.

Для определения диагностического титра диагностикума полимерного холерного антигенного на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы необходимо продолжение изучения его диагностических характеристик на панели парных сывороток, полученных от больных холерой людей с подтвержденным диагнозом.

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

Таблица 3 / Table 3

Результаты исследования специфичности экспериментального диагностикума  
The results of the study of the analytical specificity of experimental diagnosticum

Сыворотки Sera	Титр в РА Titer in agglutination reaction	Титр в РАО Titer in volume ag- glomeration reaction
Коммерческая сыворотка диагностическая холерная не O1 группы O139 адсорбированная кроличья для реакции агглютинации (РА) на стекле (серия 86) Commercial diagnostic cholera non-O1, O139 serum, adsorbed, rabbit, for agglutination reaction (AR) on the slide (series 86)	1:800	Отрицательно Negative
Кроличья экспериментальная к штамму <i>V. cholerae</i> O139 16064 Rabbit experimental serum to <i>V. cholerae</i> O139 strain 16064	1:2560	Отрицательно Negative
Кроличья экспериментальная сыворотка к <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139–O2 серогруппы Rabbit experimental serum to <i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139–O2 serogroup	1:640	Отрицательно Negative
Кроличья экспериментальная сыворотка к <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139–O5 серогруппы Rabbit experimental serum to <i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139–O5 serogroup	1:1280	Отрицательно Negative
Кроличья экспериментальная сыворотка к <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139–O22 серогруппы Rabbit experimental serum to <i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139–O22 serogroup	1:640	Отрицательно Negative
Сыворотка диагностическая шигеллезная адсорбированная поливалентная к <i>Shigella flexneri</i> I–VI (серия 69-1113) Diagnostic Shigella serum, adsorbed, polyvalent to <i>Shigella flexneri</i> I–VI (series 69-1113)	1:640	Отрицательно Negative
Сыворотка диагностическая эшерихиозная ОКА поливалентная (серия 623-0914) Diagnostic Escherichia serum OKA, polyvalent (series 623-0914)	1:640	Отрицательно Negative
Сыворотка сальмонеллезная адсорбированная О-поливалентная основных групп ABCDE (серия 23-0714) Salmonella serum, adsorbed, O-polyvalent, of the main groups ABCDE (series 23-0714)	1:640	1:20
Нормальная человеческая сыворотка № 1 Normal human serum No 1	-	Отрицательно Negative
Нормальная человеческая сыворотка № 2 Normal human serum No 2	-	Отрицательно Negative
Нормальная человеческая сыворотка № 3 Normal human serum No 3	-	Отрицательно Negative
Нормальная человеческая сыворотка № 4 Normal human serum No 4	-	Отрицательно Negative
Нормальная человеческая сыворотка № 5 Normal human serum No 5	-	Отрицательно Negative

## Список литературы

1. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 1998; 62(4):1301–14. PMID: 9841673. PMCID: PMC98947.

2. Гюлазян Н.М., Белая О.Ф., Малов В.А., Пак С.Г., Волчакова Е.В. Липополисахариды/эндотоксины грамотрицательных бактерий: роль в развитии интоксикации. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 19(2):11–6.

3. Leung D.T., Uddin T., Xu P., Aktar A., Johnson R.A., Rahman M.A., Alam M.M., Bufalo M.K., Eckhoff G., Wu-Freeman Y., Yu Y., Sultana T., Khanam F., Saha A., Chowdhury F., Khan A.I., Charles R.C., LaRocque R.C., Harris J.B., Calderwood S.B., Cováč P., Qadri F., Ryan E.T. Immune responses to the O-specific polysaccharide antigen in children who received a killed oral cholera vaccine compared to responses following natural cholera infection in Bangladesh. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(6):780–8. DOI: 10.1128/CVI.00035-13.

4. Uddin T., Aktar A., Xu P., Johnson R.A., Rahman M.A., Leung D.T., Afrin S., Aktar A., Alam M.M., Rahman A., Chowdhury F., Khan A.I., Bhuiyan T.R., Bufano M.K., Rashu R., Yu Y., Wu-Freeman Y., Harris J.B., LaRocque R.C., Charles R.C., Cováč P., Calderwood S.B., Ryan E.T., Qadri F. Immune responses to O-specific polysaccharide and lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa in adult Bangladeshi recipients of an oral killed vaccine and comparison to responses in patients with cholera. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 90(5):873–81. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0498.

5. Darveau R.P., Hancock R.E. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella thyphimurium* strains. *J. Bacteriol.* 1983; 155(2):831–8. PMID: 6409884. PMCID: PMC217756.

6. Полунина Т.А., Гусева Н.П., Кузьмиченко И.А., Девдариани З.Л., Заднова С.П., Степанов А.В., Киреев М.Н. Способ получения липополисахарида возбудителя чумы. Патент РФ № 2483112, опублик. 27.05.2013 г.

7. Марков Е.Ю., Николаев В.Б. Способ получения бактериальных липополисахаридов. Патент РФ № 2051969, опублик. 10.01.1996 г. Бюлл. № 1.

8. Westphal V.O., Lüderitz O., Bister F. Über die Extraktion von Bacterien mit Phenol/Wasser. *Zeitschrift für Naturforschung B.* 1952; 7(3):148–55. DOI: 10.1515/znb-1952-0303.

9. Galanos C., Lüderitz O., Westphal O. A New method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 1969; 9(2):245–9. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.

10. Ломов Ю.М., Терентьев А.Н., Карбышев Г.Л. Перспективы создания препаратов для индикации возбудителей ООИ и других актуальных инфекций. В кн.: Материалы IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. М.: ООО «Санэпидмедиа»; 2007; С. 60–1.

11. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.

13. Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в иммунобиологических лекарственных препаратах. ОФС. 1.7.2.0018.15 (общая фармакопейная статья). [Электронный ресурс]. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0018-15-opredelenie-nukleinykh-kislot-po-metodu-spirina-v-immunobiologicheskikh-lekarstvennykh-preparatah/ofs-1-7-2-0018-15-opredelenie-nukleinykh-kislot-po-metodu-spirina-v-immunobiologicheskikh-lekarstvennykh-preparatah/> (дата обращения 15.06.2019).

14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0/.

15. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine.* 2019; pii: S0264-410X(19)31020-5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.

16. Власов В.В. Эпидемиология: учебное пособие для вузов. М.: «ГЕОТАР-МЕД»; 2006. 462 с.

## References

1. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 1998; 62(4):1301–14. PMID: 9841673. PMCID: PMC98947.

2. Gyulazayn N.M., Belaya O.F., Malov V.A., Pak S.G., Volchakova E.V. [Lipopolysaccharides/endotoxins of gram-negative bacteria: role in intoxication development]. *Epidemiologiya i*

*Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2014; 19(2):11–6.

3. Leung D.T., Uddin T., Xu P., Aktar A., Johnson R.A., Rahman M.A., Alam M.M., Bufalo M.K., Eckhoff G., Wu-Freeman Y., Yu Y., Sultana T., Khanam F., Saha A., Chowdhury F., Khan A.I., Charles R.C., LaRocque R.C., Harris J.B., Calderwood S.B., Cováč P., Qadri F., Ryan E.T. Immune responses to the O-specific polysaccharide antigen in children who received a killed oral cholera vaccine compared to responses following natural cholera infection in Bangladesh. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(6):780–8. DOI: 10.1128/CVI.00035-13.

4. Uddin T., Aktar A., Xu P., Johnson R.A., Rahman M.A., Leung D.T., Afrin S., Aktar A., Alam M.M., Rahman A., Chowdhury F., Khan A.I., Bhuiyan T.R., Bufano M.K., Rashu R., Yu Y., Wu-Freeman Y., Harris J.B., LaRocque R.C., Charles R.C., Cováč P., Calderwood S.B., Ryan E.T., Qadri F. Immune responses to O-specific polysaccharide and lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa in adult Bangladeshi recipients of an oral killed vaccine and comparison to responses in patients with cholera. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 90(5):873–81. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0498.

5. Darveau R.P., Hancock R.E. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella thyphimurium* strains. *J. Bacteriol.* 1983; 155(2):831–8. PMID: 6409884. PMCID: PMC217756.

6. Polunina T.A., Guseva N.P., Kuz'michenko I.A., Devdariani Z.L., Zаднова S.P., Степанов A.V., Киреев M.N. [Method for the production of lipopolysaccharide of plague agent]. RF Patent No 2483112, published on May 27, 2013.

7. Марков Е.Ю., Николаев В.Б. [Method for the production of bacterial lipopolysaccharides]. RF Patent No 2051969, published on January 10, 1996. Bulletin No 1.

8. Westphal V.O., Lüderitz O., Bister F. Über die Extraktion von Bacterien mit Phenol/Wasser. *Zeitschrift für Naturforschung B.* 1952; 7(3):148–55. DOI: 10.1515/znb-1952-0303.

9. Galanos C., Lüderitz O., Westphal O. A New method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 1969; 9(2):245–9. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.

10. Ломов Ю.М., Терентьев А.Н., Карбышев Г.Л. [Prospects of creation of preparations for indication of particularly dangerous infectious agents and other relevant infections]. In: [Proceedings of the IX Assembly of the All-Russian Scientific-and-Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists, and Parasitologists]. Moscow: "Sanepidemiya" LLC; 2007. P. 60–1.

11. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous infectious Diseases. Practice Guidelines]. 2<sup>nd</sup> edition, revised and updated. Moscow: CJSC "Shiko"; 2013. 560 p.

12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.

13. [Determination of nucleic acids in immunobiological drugs, using Spirin's methodology. General Monograph 1.7.2.0018.15]. (Cited 15 June 2019). [Internet]. Available from: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0018-15-opredelenie-nukleinykh-kislot-po-metodu-spirina-v-immunobiologicheskikh-lekarstvennykh-preparatah/ofs-1-7-2-0018-15-opredelenie-nukleinykh-kislot-po-metodu-spirina-v-immunobiologicheskikh-lekarstvennykh-preparatah/>

14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0/.

15. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine.* 2019; pii: S0264-410X(19)31020-5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.

16. Власов В.В. [Epidemiology: Learning Guide for Higher Educational Institutions]. Moscow: "GEOTAR-MED"; 2006. 462 p.

## Authors:

Larionova L.V., Simakova D.I., Narkevich A.N., Arkhangel'skaya I.V., Shubin G.G. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

## Об авторах:

Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Наркевич А.Н., Архангельская И.В., Шубин Г.Г. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Поступила 22.07.19.

Отправлена на доработку 24.10.19.

Принята к публ. 28.11.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-73-78

УДК 616.98:579.841.11

Д.Н. Лучинин, Е.В. Молчанова, К.А. Ротов, А.О. Негоденко, Д.В. Викторов

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МЕЛИОИДОЗА И САПА**

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

Цель работы заключалась в проведении испытаний дезинфицирующих средств в отношении возбудителей мелиоидоза и сапа. **Материалы и методы.** Изучены 10 штаммов возбудителя мелиоидоза, 4 штамма возбудителя сапа и 5 штаммов *B. thailandensis*. Все они обладали типичными для соответствующих видов биохимическими, морфологическими, тинкториальными, культуральными и ферментативными свойствами. Использованы следующие дезинфицирующие средства: алкилдиметилбензиламмония хлорид (Sigma-Aldrich, США), глутаровый альдегид, хлорамин Б, водорода перекись медицинская, «МД-1» (ООО «Медицинская дезинфекция», Россия), «САТ-18» (ООО «Сателлит», Россия), «САТ-19» (ООО «Сателлит», Россия), «ОДС-15» (ООО «Сателлит», Россия), «Экотаб-Актив» (АО НПО «Новодез», Россия), «Септодез-Форте» (АО НПО «Новодез», Россия). В качестве тест-объектов использованы кафель, керамика, линолеум, окрашенное дерево, подкладочная клеенка, белье с выделениями больного и без, посуда с остатками пищи и без, изделия медицинского назначения из стекла, пластика, резины, силикона и металла. Критерием активности дезинфекционного средства служило отсутствие роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах. Для достижения статистической достоверности все испытания проводились трехкратно. **Результаты и обсуждение.** Проведенные исследования позволяют рекомендовать *B. pseudomallei* 97 и *B. thailandensis* 264 в качестве тест-штаммов для оценки бактерицидной активности новых дезинфицирующих средств в лабораторных условиях в отношении сапной и мелиоидозной инфекций. Все изученные дезинфицирующие средства обладают выраженной активностью в отношении возбудителей сапа и мелиоидоза и могут быть использованы в концентрациях от 0,1 до 2,5 % и экспозиции 60 мин.

**Ключевые слова:** дезинфектант, тест-штамм, эффективность обеззараживания, *B. mallei*, *B. pseudomallei*.

Корреспондирующий автор: Дмитрий Николаевич Лучинин, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Для цитирования: Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В., Ротов К.А., Негоденко А.О., Викторов Д.В. Результаты испытаний дезинфицирующих средств в отношении возбудителей мелиоидоза и сапа. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:73–78. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-73-78

D.N. Luchinin, E.V. Molchanova, K.A. Rotov, A.O. Negodenko, D.V. Viktorov

**Results of Tests of Disinfecting Materials in Regard to Melioidosis and Glanders Agents**

Vologograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

**Abstract. Objective** of the work was to conduct tests of disinfectants against pathogens of melioidosis and glanders. **Materials and methods.** 10 strains of the causative agent of melioidosis, 4 strains of the glanders pathogen, and 5 strains of *B. thailandensis* were studied. All of them possessed biochemical, morphological, tinctorial, cultural and enzymatic properties typical of the respective species. The following disinfectants were used in the study: alkyldimethylbenzylammonium chloride (Sigma-Aldrich, USA), glutaraldehyde, chloramine B, hydrogen peroxide medical, MD-1 (Medical Disinfection LLC, Russia), CAT-18 (LLC Satellite, Russia), SAT-19 (Satellite LLC, Russia), ODS-15 (Satellite LLC, Russia), Ecotab-Active (Novodez JSC, Russia), Septodez-Forte (Novodez, JSC Russia). As test objects, tiles, ceramics, linoleum, painted wood, lining oilcloth, linen with and without sick discharge, dishes with and without food residues, medical products made of glass, plastic, rubber, silicone and metal were used. The criterion for the activity of the disinfectant was the lack of growth of microorganisms on solid and liquid nutrient media. To achieve statistical reliability, all tests were performed three times. **Results and discussion.** The conducted studies allow us to recommend *B. pseudomallei* 97 and *B. thailandensis* 264 as test strains for evaluating the bactericidal activity of new disinfectants in the laboratory against glanders and melioidosis infections. All studied disinfectants have a pronounced activity against glanders and melioidosis pathogens and can be used in concentrations from 0.1 to 2.5 %, for 60 minutes exposure.

**Key words:** disinfectant, test strain, disinfection efficiency, *B. mallei*, *B. pseudomallei*.

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

Corresponding author: Dmitry N. Luchinin, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Citation: Luchinin D.N., Molchanova E.V., Rotov K.A., Negodenko A.O., Viktorov D.V. Results of Tests of Disinfecting Materials in Regard to Melioidosis and Glanders Agents. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:73–78. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-73-78

Received 24.09.19. Revised 13.11.19. Accepted 19.11.19.

*Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* – возбудители сапа и мелиоидоза, которые являются особо опасными инфекционными заболеваниями. *B. pseudomallei* широко распространен на терри-

тории Северной Австралии и стран Юго-Восточной Азии [1, 2]. *B. mallei* эндемичен для ряда стран Азии, Северной Африки, Южной Америки и Ближнего Востока [3–5].

За историю Российской Федерации не зарегистрировано ни одного случая заболевания сапом и мелиоидозом на ее территории. Однако, в связи со значительно возросшими грузопотоками, увеличением туристического трафика и торгово-экономических связей со странами, эндемичными по данным инфекциям, существует реальная угроза завоза данных возбудителей на территорию нашей страны [6]. Более того, *B. mallei* и *B. pseudomallei* рассматриваются как потенциальные агенты для применения их в качестве биологического оружия [7, 8].

Все вышесказанное обуславливает необходимость развития и совершенствования профилактических и противоэпидемических мероприятий, направленных на обеспечение биологической безопасности населения, неотъемлемой частью которых является дезинфекция [9].

Согласно СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» основными средствами химической дезинфекции возбудителей сапа и мелиоидоза являются хлор- и кислородоактивные соединения (хлорамин, перекись водорода, хлорная известь, гипохлорит натрия и т.д.). Несмотря на эффективность, они обладают рядом существенных недостатков: высокая тканевая токсичность, сильное раздражающее действие на слизистые оболочки органов зрения и дыхания, высокая коррозионная активность, отсутствие моющих свойств и т.д. [10]. Однако возможность использования более современных препаратов, например, дезсредств, действующим веществом которых являются четвертично-аммонийные соединения (ЧАС) и глутаровый альдегид (ГА), в данном документе отражена в недостаточной мере.

В России ежегодно регистрируются десятки новых дезинфицирующих средств (ДС) на основе ЧАС и ГА, при этом лишь малая доля этих препаратов прошла испытания эффективности в отношении патогенных биологических агентов (ПБА) I–II групп патогенности. В связи с этим представляется важным поиск новых высокоэффективных, полифункциональных и экологически малоопасных дезинфицирующих средств, активных в отношении *B. mallei* и *B. pseudomallei*.

Таким образом, **целью** работы явилось проведение оценки эффективности новых дезинфицирующих средств в отношении возбудителей мелиоидоза и сапа.

### Материалы и методы

В исследовании изучены 10 штаммов возбудителя мелиоидоза: *B. pseudomallei* 1, *B. pseudomallei* 97, *B. pseudomallei* 100, *B. pseudomallei* 101, *B. pseudomallei* 114, *B. pseudomallei* 116, *B. pseudomallei* 117, *B. pseudomallei* 128, *B. pseudomallei* 134, *B. pseudomallei* 60806; 4 штамма возбудителя сапа: *B. mallei* 8, *B. mallei* 10230, *B. mallei* Богор-37, *B. mallei* Будапешт; 5 штаммов *B. thailandensis*: *B. thailandensis* 251, *B. thailandensis* 264, *B. thailandensis* 265, *B. thailandensis* 295, *B. thailandensis* 299. Все штаммы обладали типичными для соответствующих видов биохимическими, морфологическими, тинкториальными, культуральными и ферментативными свойствами.

Микроорганизмы культивировали на питательных средах: питательный агар с 1 % пептона (Himedia, Индия), питательный бульон с 1 % пептона (Himedia, Индия).

В исследовании использованы следующие дезинфицирующие средства: алкилдиметилбензиламмония хлорид (АДБАХ, Катамин АБ) (Sigma-Aldrich, США), глутаровый альдегид (ГА) (Carl Roth, Германия), хлорамин Б (ХБ) (Bochimie, Чехия), водорода перекись медицинская (ПВ) (ООО «Иновация», Россия), «МД-1» (ООО «Медицинская дезинфекция», Россия), «САТ-18» (ООО «Сателлит», Россия), «САТ-19» (ООО «Сателлит», Россия), «ОДС-15» (ООО «Сателлит», Россия), «Эжотаб-Актив» (АО НПО «Новодез», Россия), «Септодез-Форте» (АО НПО «Новодез», Россия). Состав изученных дезинфектантов представлен в табл. 1.

Устойчивость микроорганизмов к эталонным дезинфицирующим средствам определяли методом батистовых тест-объектов. Разработку режимов применения ДС для обеззараживания объектов, контактированных возбудителями сапа и мелиоидоза, проводили согласно Руководству Р 4.2.2643-10 «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности». Для инактивации действующего вещества ДС применяли универсальный нейтрализатор, содержащий в своем составе 3 % Твин-80, 2 % сапонина, 0,1 % гистицина, 0,1 % цистеина и 0,5 % тиосульфата натрия.

Критерием активности дезинфекционного средства служило отсутствие роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах. Для достижения статистической достоверности все испытания проводились трехкратно.

Все работы с микроорганизмами проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

### Результаты и обсуждение

Согласно Руководству Р 4.2.2643-10 при изучении бактерицидной активности дезинфицирующих средств и их субстанций используются следующие микроорганизмы: *Escherichia coli* 1257, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* штамм 906. При этом тест-микроорганизмы для оценки активности ДС в отношении возбудителей сапа и мелиоидоза не предусмотрены данным нормативно-правовым документом. В связи с этим на первом этапе исследования для определения штаммов патогенных буркхольдерий,

Таблица 1 / Table 1

**Состав исследованных дезинфицирующих средств**  
**The composition of the investigated disinfectants**

Название препарата Product name	Состав препарата (по данным производителей) Product composition (According to manufacturer's description)
МД-1	Содержит в качестве действующих веществ 9 % комплекса четвертичных аммонийных соединений (алкилдиметилбензиламмоний хлорид и дидецилдиметиламмоний хлорид), N,N-бис(3-аминопропил) додециламин – 3 %, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид – 7 % Contains 9 % complex of quaternary ammonia compounds as active ingredients (alkyldimethylbenzylammonium chloride and didecyldimethylammonium chloride), N,N-bis(3-aminopropyl) dodecylamine – 3 %, polyhexamethylene guanidine hydrochloride – 7 %
CAT-18	Содержит в качестве действующих веществ 9 % комплекса четвертичных аммонийных соединений (алкилдиметилбензиламмоний хлорид и алкилдиметилэтилбензиламмоний хлорид), N,N-бис(3-аминопропил) додециламин – 3 % Contains 9 % complex of quaternary ammonia compounds as active ingredients (alkyldimethylbenzylammonium chloride and alkyldimethylethylbenzylammonium chloride), N,N-bis(3-aminopropyl) dodecylamine – 3 %
CAT-19	Содержит в качестве действующих веществ 11 % комплекса четвертичных аммонийных соединений (алкилдиметилбензиламмоний хлорид и дидецилдиметиламмоний хлорид), 5 % полигексаметиленгуанидин гидрохлорида Contains 11 % complex of quaternary ammonia compounds as active ingredients (alkyldimethylbenzylammonium chloride and didecyldimethylammonium chloride), 5 % polyhexamethylene guanidine hydrochloride
ОДС-15	Содержит в своем составе в качестве действующих веществ 10 % комплекса четвертичных аммонийных соединений (4 % алкилдиметилбензиламмоний хлорида, 3 % октилдидецил-метиламмоний хлорида, 1,8 % дидецилдиметиламмоний хлорида, 1,2 % диоктилдими-ламмоний хлорида), 4,0 % N,N-бис(3-аминопропил) додециламина Contains 10 % complex of quaternary ammonia compounds as active ingredients (4 % alkyldimethylbenzylammonium chloride, 3 % octyldidecyldimethylammonium chloride, 1.8 % didecyldimethylammonium chloride), 4.0 % N,N-bis(3-aminopropyl) dodecylamine
Экотаб-Актив Ecotab-Active	Содержит в своем составе в качестве действующих веществ 50 % комплекса четвертичных аммонийных соединений (25 % алкилдиметилбензиламмония хлорида и 25 % алкилдиметилэтилбензиламмония хлорида), 3 % глутарового альдегида Contains 50 % complex of quaternary ammonia compounds as active ingredients (25 % alkyldimethylbenzylammonium chloride and 25 % alkyldimethylethylbenzylammonium chloride), 3 % glutaric aldehyde
Септодез-Форте Septodes-Forte	Содержит в своем составе в качестве действующих веществ (ДВ) 45 % алкилдиметилбензиламмония хлорида, 3 % глутарового альдегида Contains 45 % alkyldimethylbenzylammonium chloride, 3 % glutaric aldehyde as active ingredients

которые могут быть использованы в качестве тестовых, необходимо проведение исследования их устойчивости к эталонным дезинфицирующим агентам.

Как известно, к грамотрицательным микроорганизмам, предназначенным для оценки эффектив-

ности дезинфектантов, предъявляются определенные требования по резистентности к эталонным ДС: хлорамин Б – 0,02 % (по препарату), катамин АБ – 0,025 % (по активному веществу), глутаровый альдегид – 0,03 % (по активному веществу), перекись

Таблица 2 / Table 2

**Устойчивость изучаемых буркгольдерий к действию 0,03 % раствора глутарового альдегида**  
**The stability of the studied *Burkholderia* to the action of a 0.03 % solution of glutaric aldehyde**

Вид и штамм микроорганизма Species and strain of microorganism	Время устойчивости к действию 0,03 % раствора глутарового альдегида (мин) Time of tolerance to 0.03 % solution of glutaric aldehyde (min)					
	5	10	15	20	25	30
<i>B. pseudomallei</i> 1	+	+	+	+	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 97	+	+	+	+	+	-
<i>B. pseudomallei</i> 100	+	-	-	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 101	+	+	+	+	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 114	+	+	-	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 116	+	+	+	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 117	+	+	-	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 128	+	+	+	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 134	+	+	+	+	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 60806	+	+	-	-	-	-
<i>B. mallei</i> 8	+	+	-	-	-	-
<i>B. mallei</i> 10230	+	+	+	-	-	-
<i>B. mallei</i> Богор-37	+	-	-	-	-	-
<i>B. mallei</i> Будапешт	+	+	-	-	-	-
<i>B. thailandensis</i> 251	+	-	-	-	-	-
<i>B. thailandensis</i> 264	+	+	+	+	+	-
<i>B. thailandensis</i> 265	+	+	+	-	-	-
<i>B. thailandensis</i> 295	+	+	+	+	+	-
<i>B. thailandensis</i> 299	+	+	+	+	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста, «+» – наличие роста.  
Note: “-” – lack of growth, “+” – occurrence of growth.

Таблица 3 / Table 3

## Устойчивость изучаемых буркхольдерий к действию 0,025 % раствора алкилдиметилбензиламмония хлорида (АДБАХ)

The resistance of the studied *Burkholderia* to the action of a 0.025 % solution of alkyl dimethylbenzylammonium chloride (ADBAC)

Вид и штамм микроорганизма Species and strain of microorganism	Время устойчивости к действию 0,025 % раствора АДБАХ (мин) Time of tolerance to 0.025 % solution of ADBAC (min)					
	60	90	120	150	180	210
<i>B. pseudomallei</i> 1	+	-	-	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 97	+	+	+	+	+	-
<i>B. pseudomallei</i> 100	+	+	-	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 101	+	+	-	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 114	+	+	+	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 116	+	+	-	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 117	+	+	+	+	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 128	+	+	-	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 134	+	+	+	+	+	-
<i>B. pseudomallei</i> 60806	+	+	-	-	-	-
<i>B. thailandensis</i> 251	+	+	+	+	-	-
<i>B. thailandensis</i> 264	+	+	+	+	+	-
<i>B. thailandensis</i> 265	+	+	+	-	-	-
<i>B. thailandensis</i> 295	+	+	+	+	-	-
<i>B. thailandensis</i> 299	+	+	+	-	-	-
<i>B. mallei</i> 8	-	-	-	-	-	-
<i>B. mallei</i> 10230	+	-	-	-	-	-
<i>B. mallei</i> Богор-37	-	-	-	-	-	-
<i>B. mallei</i> Будапешт	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста, «+» – наличие роста.  
Note: “-” – lack of growth, “+” – occurrence of growth.

водорода – 2 % (по активному веществу). При этом длительность воздействия, после которого возбудитель должен сохранять жизнеспособность, варьирует в зависимости от дезинфицирующего агента. Для ПВ она составляет 10 мин, для АДБАХ, ГА и ХБ – 20, 10 и 5 мин соответственно.

Все тестируемые штаммы были устойчивыми к действию хлорамина Б, алкилдиметилбензиламмония хлориду и глутаровому альдегиду. При этом наиболее устойчивыми ко всем трем дезинфектантам оказались *B. pseudomallei* 97 и *B. thailandensis* 264. Однако ни один из исследуемых микроорганиз-

Таблица 4 / Table 4

## Устойчивость изучаемых буркхольдерий к действию 0,4 % раствора перекиси водорода

The stability of the studied *Burkholderia* to the action of 0.4 % solution of hydrogen peroxide

Вид и штамм микроорганизма Species and strain of microorganism	Время устойчивости к действию 0,4 % раствора ПВ (мин) Time of tolerance to 0.4 % solution of hydrogen peroxide (min)		
	5	10	15
<i>B. pseudomallei</i> 1	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 97	+	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 100	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 101	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 114	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 116	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 117	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 128	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 134	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 60806	+	-	-
<i>B. mallei</i> 8	-	-	-
<i>B. mallei</i> 10230	-	-	-
<i>B. mallei</i> Богор-37	-	-	-
<i>B. mallei</i> Budapest	-	-	-
<i>B. thailandensis</i> 251	-	-	-
<i>B. thailandensis</i> 264	+	-	-
<i>B. thailandensis</i> 265	-	-	-
<i>B. thailandensis</i> 295	-	-	-
<i>B. thailandensis</i> 299	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста, «+» – наличие роста.  
Note: “-” – lack of growth, “+” – occurrence of growth.

Таблица 5 / Table 5

**Активность дезинфицирующих средств при обеззараживании объектов, контаминированных возбудителями сапа и мелиоидоза**  
**Activity of sanitizers during disinfection of objects contaminated with agents of glanders and melioidosis**

Наименование дезинфицирующего средства Product name	Эффективный режим обеззараживания (% по препарату/мин) Effective mode of disinfection (% by preparation/ min)					
	Поверхности в помещениях, жесткая мебель Surfaces in rooms, hard furniture	Белье, не загрязненное белковыми выделениями Linens non-contaminated by protein secretion	Белье, загрязненное белковыми выделениями Linens contaminated by protein secretion	Изделия медицинского назначения Medical products/devices	Предметы ухода за больными Patient-care items	Посуда с остатками пищи/лабораторная Dishware with remnants of food/laboratory utensils
МД-1/MD-1	2,5/60	1,0/60	1,0/60	1,5/60	1,5/60	2,0/60
CAT-18/SAT-18	2,0/60	0,5/60	1,0/60	0,5/60	1,5/60	1,5/60
CAT-19/SAT-19	2,0/60	1,0/60	1,5/60	1,5/60	1,5/60	1,5/60
ОДС-15/ODS-15	2,5/60	1,5/60	2,0/60	2,0/60	2,0/60	2,0/60
Экотаб-Актив Ecotab-Active	0,5/60	0,5/60	1,0/60	0,5/60	0,5/60	0,5/60
Септодез-Форте Septodes-Forte	0,5/60	0,1/60	0,3/60	0,3/60	0,5/60	0,3/60

мов не проявил необходимой степени резистентности к воздействию пероксида водорода. Так, только 3 штамма из 18 сохраняли жизнеспособность в 0,4 % растворе ПВ в течение 5 мин. При дальнейшем повышении концентрации кислородоактивного дезинфектанта гибель патогенов наступала практически моментально (табл. 2–4).

Исходя из полученных данных, в качестве тест-штаммов для оценки эффективности и безопасности дезинфекционных средств в отношении возбудителей мелиоидоза и сапа выбраны *B. pseudomallei* 97 и *B. thailandensis* 264.

На втором этапе исследования проведено испытание эффективности дезинфекционных средств в отношении возбудителей сапной и мелиоидозной инфекций с использованием вышеуказанных тест-штаммов. Учитывая тот факт, что возбудитель мелиоидоза относится к микроорганизмам II группы патогенности (опасности) и работа с ним требует использования противочумного костюма I типа и бокса микробиологической безопасности III класса, предварительная отработка методик обеззараживания проводилась на микроорганизме *B. thailandensis* 264, так как *B. thailandensis* относится к III группе патогенности и является менее вирулентным, но при этом обладает сопоставимой степенью устойчивости к эталонным дезинфицирующим средствам.

В работе использованы два средства, содержащие в своем составе глутаровый альдегид: «Экотаб-Актив» и «Септодез-Форте», и четыре дезинфектанта, в составе которых ГА отсутствовал: «МД-1», «САТ-18», «САТ-19» и «ОДС-15».

Эффективные режимы использования испытанных дезинфектантов в отношении возбудителей мелиоидоза и сапа представлены в табл. 5.

Сначала определялись режимы обеззараживания препаратом «САТ-18» различных видов поверхностей. Исследование проводили методом аэрозольного орошения дезинфектанта в концентрациях 0,3–5 % (по препарату) с экспозицией 60 мин. Установлено, что возбудитель погибал только при

2 % концентрации рабочего раствора препарата.

Далее отработаны режимы обеззараживания белья и изделий медицинского назначения (ИМН). При замачивании «чистого» белья полная деконтаминация происходила через 60 мин при концентрации 0,5 %. Данный режим дезинфекции также оказался эффективным для обработки ИМН. Для обеззараживания белья, загрязненного белковыми выделениями, понадобились более жесткие условия дезинфекции (1,0 % при экспозиции 60 мин). При дезинфекции посуды и предметов ухода за больными полная гибель микроорганизма обеспечивалась обработкой 1,5 % раствором препарата в течение одного часа. Эффективность остальных препаратов изучали аналогично алгоритму исследований, проводимым для «САТ-18».

Полученные нами результаты согласуются с данными аналогичных исследований [11, 12], в которых также показано наличие у ЧАС активности в отношении патогенных буркгольдерий. При этом авторами отмечается более высокая выживаемость патогенов при использовании четвертично-аммонийных соединений, нежели при обработке дезинфектантами, относящимися к другим химическим классам. Стоит отметить, что в наших исследованиях препараты «Экотаб-Актив» и «Септодез-Форте» проявляли свою активность в намного меньших концентрациях, нежели композиции, в составе которых отсутствовал глутаровый альдегид. По всей видимости, оба этих факта можно объяснить наличием эффлюксных систем RND/MFP/OMF типов у бактерий рода *Burkholderia* [13–15], которые обуславливают устойчивость к четвертично-аммонийным соединениям [16].

Таким образом, полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют о том, что все изученные дезинфицирующие средства обладают выраженной активностью в отношении возбудителей сапа и мелиоидоза и могут быть использованы в концентрациях от 0,1 до 2,5 % и экспозиции 60 мин. Данный факт говорит о возможности расширения

перечня средств, предназначенных для обеззараживания объектов, контаминированных *B. mallei* и *B. pseudomallei*, препаратами «МД-1» «САТ-18», «САТ-19» «ОДС-15», «Экотаб-Актив» и «Септодез-Форте».

Проведенные исследования также позволяют рекомендовать *B. pseudomallei* 97 и *B. thailandensis* 264 в качестве тест-штаммов для оценки бактерицидной активности новых дезинфицирующих средств в лабораторных условиях.

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

#### Список литературы:

1. Cheng, A.C., Currie, B.J. Melioidosis: Epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):383–416. DOI: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005.
2. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A.B., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P.J., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.* 2016; 1:15008. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.
3. Al-Ani F.K., Roberson J. Glanders in horses: A review of the literature. *Vet. Arhiv.* 2007; 77(3):203–18.
4. Hornstra H., Pearson T., Georgia S., Liguori A., Dale J., Price E., O'Neill M., DeShazer D., Muhammad G., Saqib M., Naureen A., Keim P. Molecular epidemiology of glanders, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15:2036–9. DOI: 10.3201/eid1512.090738.
5. Elschner M.C., Klaus C.U., Liebler-Tenorio E., Schmoock G., Wohlsein P., Tinschmann O., Lange E., Kaden V., Klopffleisch R., Melzer F., Rassbach A., Neubauer H. *Burkholderia mallei* infection in a horse imported from Brazil. *Equine Vet. Educ.* 2009; 21:147–50. DOI: 10.2746/095777309X401071.
6. Илюхин В.И. Мелиоидоз. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 1999; 4:49–51.
7. Geissler E., Moon J., editors. Biological and Toxin Weapons: Research, Development and Use from the Middle Ages to 1945. Oxford: Oxford University Press; 1999. 277 p.
8. Pal M., Tsegaye M., Girzaw F., Bedada H., Godishala V., Kandi V. An Overview on Biological Weapons and Bioterrorism. *American Journal of Biomedical Research.* 2017; 5(2):24–34. DOI: 10.12691/ajbr-5-2-2.
9. Соколова Н.Ф. Значение дезинфекции в комплексе профилактических и противоэпидемических мероприятий. *Дезинфекционное дело.* 2015; 94(4):28–30.
10. Пхакадзе Т.Я. Антисептические и дезинфицирующие средства в профилактике нозокомиальных инфекций. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2002; 4(1):42–8.
11. Calfee M.W., Wendling M. Inactivation of vegetative bacterial threat agents on environmental surfaces. *Sci Total Environ.* 2013; 443:387–96. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.002.
12. Calfee M.W., Wendling M. Inactivation of *Burkholderia pseudomallei* on environmental surfaces using spray-applied, common liquid disinfectants. *Lett. Appl. Microbiol.* 2015; 61(5):418–22. DOI: 10.1111/lam.12487.
13. Moreira M.A.S., de Souza E.C., de Moraes C.A. Multidrug efflux systems in gram-negative bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2004; 35(1–2):19–28. DOI: 10.1590/S1517-83822004000100003.
14. Nikaido H. Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 27 (Suppl 1):S32–41. DOI: 10.1086/514920.
15. Poole K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2001; 4(5):500–8. DOI: 10.1016/S1369-5274(00)00242-3.
16. Russell A.D. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 2002; 92(S1):121S–135S. DOI: 10.1046/j.1365-2672.92.5s1.12.x.

2002; 92(S1):121S–135S. DOI: 10.1046/j.1365-2672.92.5s1.12.x.

#### References

1. Cheng, A.C., Currie, B.J. Melioidosis: Epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):383–416. DOI: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005.
2. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A.B., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P.J., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.* 2016; 1:15008. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.
3. Al-Ani F.K., Roberson J. Glanders in horses: A review of the literature. *Vet. Arhiv.* 2007; 77(3):203–18.
4. Hornstra H., Pearson T., Georgia S., Liguori A., Dale J., Price E., O'Neill M., DeShazer D., Muhammad G., Saqib M., Naureen A., Keim P. Molecular epidemiology of glanders, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15:2036–9. DOI: 10.3201/eid1512.090738.
5. Elschner M.C., Klaus C.U., Liebler-Tenorio E., Schmoock G., Wohlsein P., Tinschmann O., Lange E., Kaden V., Klopffleisch R., Melzer F., Rassbach A., Neubauer H. *Burkholderia mallei* infection in a horse imported from Brazil. *Equine Vet. Educ.* 2009; 21:147–50. DOI: 10.2746/095777309X401071.
6. Ilyukhin V.I. [Melioidosis]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 1999; 4:49–51.
7. Geissler E., Moon J., editors. Biological and Toxin Weapons: Research, Development and Use from the Middle Ages to 1945. Oxford: Oxford University Press; 1999. 277 p.
8. Pal M., Tsegaye M., Girzaw F., Bedada H., Godishala V., Kandi V. An Overview on Biological Weapons and Bioterrorism. *American Journal of Biomedical Research.* 2017; 5(2):24–34. DOI: 10.12691/ajbr-5-2-2.
9. Sokolova N.F. [Significance of disinfection in the complex of prophylactic and anti-epidemic measures]. *Dezinfektsionnoe Delo [Disinfection Affairs]*. 2015; 94(4):28–30.
10. Pkhakadze T.Ya. [Antiseptic and disinfecting agents in prophylaxis of nosocomial infections]. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya [Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy]*. 2002; 4(1):42–8.
11. Calfee M.W., Wendling M. Inactivation of vegetative bacterial threat agents on environmental surfaces. *Sci Total Environ.* 2013; 443:387–96. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.002.
12. Calfee M.W., Wendling M. Inactivation of *Burkholderia pseudomallei* on environmental surfaces using spray-applied, common liquid disinfectants. *Lett. Appl. Microbiol.* 2015; 61(5):418–22. DOI: 10.1111/lam.12487.
13. Moreira M.A.S., de Souza E.C., de Moraes C.A. Multidrug efflux systems in gram-negative bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2004; 35(1–2):19–28. DOI: 10.1590/S1517-83822004000100003.
14. Nikaido H. Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 27 (Suppl 1):S32–41. DOI: 10.1086/514920.
15. Poole K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2001; 4(5):500–8. DOI: 10.1016/S1369-5274(00)00242-3.
16. Russell A.D. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 2002; 92(S1):121S–135S. DOI: 10.1046/j.1365-2672.92.5s1.12.x.

#### Authors:

Luchinin D.N., Molchanova E.V., Rotov K.A., Negodenko A.O., Viktorov D.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

#### Об авторах:

Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В., Ротов К.А., Негоденко А.О., Викторов Д.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Поступила 24.09.19.

Отправлена на доработку 13.11.19.

Принята к публ. 19.11.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-79-84

УДК 616.98:578.8(470)

О.В. Малецкая<sup>1</sup>, Т.В. Таран<sup>1</sup>, Д.А. Прислегина<sup>1</sup>, А.Е. Платонов<sup>2</sup>, В.М. Дубянский<sup>1</sup>, А.С. Волынкина<sup>1</sup>,  
Н.Ф. Василенко<sup>1</sup>, Ю.Н. Тохов<sup>1</sup>, Н.В. Цапко<sup>1</sup>

## ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫЕ ВИРУСНЫЕ ЛИХОРАДКИ НА ЮГЕ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ. ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

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

<sup>2</sup>ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», Москва, Российская Федерация

**Цель** – определение современных эпизоотических и эпидемических особенностей геморрагической лихорадки с почечным синдромом на юге европейской части России. **Материалы и методы.** Карты эпидемиологического очага инфекционного заболевания, ежегодные итоговые донесения (2009–2018 гг.), сведения об эпизоотическом мониторинге, предоставленные Управлениями Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Южного и Северо-Кавказского федеральных округов. Использованы описательные, аналитические методы и ретроспективный эпидемиологический анализ. **Результаты и обсуждение.** Циркуляция хантавируса подтверждена на территории Волгоградской и Астраханской областей, Ставропольского и Краснодарского краев, республик Адыгея, Калмыкия и Крым. Однако несомненное эпидемиологическое значение имеют две географически и генетически изолированные группы хантавирусов, циркулирующие в Волгоградской области и в горно-предгорной зоне Краснодарского края и Республики Адыгея. За период 2009–2018 гг. выявлено 152 случая ГЛПС с ежегодными колебаниями от 4 до 25 случаев. Практически все больные проживали в Волгоградской области (44 случая), где заболеваемость обусловлена вирусом ГЛПС-ПУУ, или в Краснодарском крае (98 случаев), где циркулирует хантавирус ГЛПС ДОБ-Ар. Тяжелые клинические формы в два раза чаще имели место при заражении вирусом ГЛПС-ДОБ-Ар, летальный исход зарегистрирован у одного больного, инфицированного ГЛПС-ПУУ. Соответствующий предварительный диагноз в Волгоградской области поставлен 56,3 % больным, в Краснодарском крае и в Республике Адыгея – только 31,7 % больных. На европейском юге России расположены разные природные очаги ГЛПС, отличающиеся по видам носителей возбудителя и по типу циркулирующих в них хантавирусов – ГЛПС-ПУУ, ГЛПС-ДОБ, ГЛПС Тула и ГЛПС-ДОБ-Ар. Высоким эпидемическим потенциалом обладают природные очаги с циркуляцией вирусов ГЛПС-ПУУ и ГЛПС-ДОБ-Ар. Тяжелые формы заболевания чаще наблюдаются при заражении вирусом ГЛПС-ДОБ-Ар.

**Ключевые слова:** геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хантавирусы, эпидемиологическая ситуация, природный очаг, эпидемиологический надзор, эпидемическая опасность, мониторинг.

Корреспондирующий автор: Малецкая Ольга Викторовна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Малецкая О.В., Таран Т.В., Прислегина Д.А., Платонов А.Е., Дубянский В.М., Волынкина А.С., Василенко Н.Ф., Тохов Ю.Н., Цапко Н.В. Природно-очаговые вирусные лихорадки на юге европейской части России. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 4:79–84. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-79-84

O.V. Maletskaia<sup>1</sup>, T.V. Taran<sup>1</sup>, D.A. Prislegina<sup>1</sup>, A.E. Platonov<sup>2</sup>, V.M. Dubyansky<sup>1</sup>, A.S. Volynkina<sup>1</sup>,  
N.F. Vasilenko<sup>1</sup>, Yu. N. Tokhov<sup>1</sup>, N.V. Tsapko<sup>1</sup>

## Natural Focal Viral Fevers in the South of the European Part of Russia. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome

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

<sup>2</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

**Abstract. Objective** of the study was to determine the modern epizootic and epidemic peculiarities of hemorrhagic fever with renal syndrome in the south of the European part of Russia. **Materials and methods.** Data of statistical documentation (epidemiological survey of the infectious disease focus, annual summary reports dated 2009–2018) and epizootic monitoring data submitted by the Rospotrebnadzor Administrations and the Centers of Hygiene and Epidemiology in the constituent entities of the Southern and the North Caucasian Federal Districts were used. Descriptive, analytical methods and retrospective epidemiological analysis were applied. **Results and discussion.** The circulation of hantavirus in the Volgograd and Astrakhan Regions, Stavropol and Krasnodar Territories, Republics of Adygeya, Kalmykia and Crimea was confirmed. However, two geographically and genetically isolated groups of hantaviruses circulating in the Volgograd Region and in the mountain-foothill zone of the Krasnodar Territory and the Republic of Adygeya were the most epidemiologically significant. Over the period of 2009–2018, 152 HFRS cases with annual fluctuations from 4 to 25 cases were registered. Almost all patients lived in the Volgograd Region (44 cases), where the incidence is caused by the HFRS-Puumala virus, or in the Krasnodar Territory (98 cases), where the HFRS Hantavirus Dobrava-Ap circulates. In HFRS patients with the HFRS-Dobrava-Ap virus severe clinical forms were noted at twice the rate, a fatal outcome in one patient with HFRS-Puumala was recorded. The correct preliminary diagnosis was made for 56.3 per cent of patients in the Volgograd Region and only for 31.7 per cent of patients in the Krasnodar Territory and in the Republic of Adygeya. There are different types of natural HFRS foci in the European south of Russia, they vary by the type of hosts and hantaviruses circulating in them – Puumala, Dobrava, Tula, and Dobrava-Ap. Natural foci where of HFRS-PUU and HFRS-DOB-Ap viruses circulate have high epidemic potential. Severe forms of the HFRS are more often observed in patients with the HFRS-DOB-Ap virus.

**Key words:** hemorrhagic fever with renal syndrome, hantaviruses, epidemiological situation, natural focus, epidemiological surveillance, epidemic hazard, monitoring.

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

**Corresponding author:** Olga V. Maletskaya, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

**Citation:** Maletskaya O.V., Taran T.V., Prisleгина D.A., Platonov A.E., Dubyansky V.M., Volynkina A.S., Vasilenko N.F., Tokhov Yu.N., Tsapko N.V. Natural Focal Viral Fevers in the South of the European Part of Russia. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:79–84. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-79-84

**Funding:** The study was funded within the framework of the Grant of the Russian Science Foundation (project No19-75-20088 "Creation of ERS-based methodology for analysis and forecasting of the impact of climatic conditions and ecological factors on the incidence of natural-focal infections") – executive officers Platonov A.E., Dubyansky V.M., Prisleгина D.A.

Received 30.09.19. Revised 28.10.19. Accepted 06.11.19.

Природно-очаговые вирусные лихорадки всегда представляли серьезную угрозу здоровью населения многих стран мира, проживающего в различных географических регионах [1, 2]. Эта проблема актуальна и для Российской Федерации [3–6]. Только на юге ее европейской части сохраняется достаточно высокая эпизоотическая и эпидемическая активность природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), лихорадки Западного Нила и Крымской геморрагической лихорадки – вирусных инфекционных болезней, имеющих существенные эпизоотологические и эпидемиологические отличия, а также климатическую и ландшафтную приуроченность. В то же время, возбудители этих инфекций отнесены ко II группе патогенности (опасности), и заболеваемость ими регистрируются ежегодно. Медицинская значимость природно-очаговых вирусных лихорадок определяется тяжестью клинического течения и высокой летальностью, высокой стоимостью лечения и проведения противоэпидемических (профилактических) мероприятий, частотой неблагоприятных исходов, непредсказуемостью вспышечной заболеваемости, возможностью использования их возбудителей в качестве биологического оружия.

В последние годы получены новые научные данные о функционировании природных очагов этих инфекционных болезней на территории России, свойствах их возбудителей; получены новые сведения о хантавирусах, циркулирующих в отдельных регионах юга Российской Федерации.

Вирусные лихорадки в автономно функционирующих природных очагах южного региона России имеют свои особенности, поэтому их изучение важно для выработки адекватной тактики организации профилактических мероприятий на конкретной очаговой территории и для прогнозирования эпидемической ситуации.

**Цель** – определение современных эпизоотических и эпидемических особенностей ГЛПС на юге европейской части России.

### Материалы и методы

При выполнении работы использован метод эпидемиологического анализа, состоящий из трех этапов (сбор данных, описательный этап, аналитический этап). Для проведения анализа заболеваемости использовали сведения карт эпидемиологического обследования очага инфекционного заболевания

(Форма № 357/у), еженедельные и ежегодные итоговые донесения по заболеваемости ГЛПС Управлений Роспотребнадзора, для анализа эпизоотологической обстановки – сведения ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» и противочумных учреждений Роспотребнадзора (за период 2009–2018 гг.), предоставленные Научно-методическому центру по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности для субъектов Северо-Кавказского и Южного федеральных округов. Лабораторные исследования суспензий легких мелких млекопитающих, добытых при проведении эпизоотологического обследования территории Ставропольского и края в 2016–2018 гг., осуществляли методом ПЦР в соответствии с протоколом, предложенным Klempa (2006 г.) [7]. Молекулярно-генетическую идентификацию хантавирусов проводили на основании анализа нуклеотидной последовательности фрагмента L-сегмента генома вируса размером 347 н.о. Анализ уровня генетического родства и построение филогенетических деревьев проводили в программе Mega 5.05. с использованием метода Neighbor joining, по алгоритму Kimura-2. Полученные данные обрабатывали с использованием программы «Microsoft Office Excel 2010».

### Результаты и обсуждение

ГЛПС – вирусный нетрансмиссивный природно-очаговый зооноз, широко распространенный в умеренных широтах Евразии (преимущественно в лесной и лесостепной зонах), а в России устойчиво занимающий первое место по заболеваемости среди природно-очаговых зоонозов. По ежегодной мировой заболеваемости ГЛПС Россия (5–6 тыс. случаев в год) уступает только Китаю (50 тыс. случаев) [8]. Резервуаром и источником инфекции для человека являются мышевидные грызуны; каждый тип хантавируса тесно связан с определенным видом грызуна. Заражение человека происходит главным образом при реализации аэрозольного механизма передачи вируса, кроме того, инфицирование возможно контактным или фекально-оральным механизмами. Наибольшее значение имеют воздушно-пылевой и алиментарный пути передачи вируса человеку. Случаи передачи возбудителя ГЛПС от человека к человеку не установлены.

Более 98 % случаев заболевания ГЛПС в России зарегистрированы на административных территории

ях европейской части страны, где заражение людей связывают с высокопатогенным вирусом Пуумала (ГЛПС-ПУУ), основной резервуарный хозяин которого рыжая полевка *Myodes glareolus*, и в лесостепной зоне Центрального Черноземья – с вирусом ГЛПС подтипа Добрава-Аа (ДОБ-Аа), основным резервуарным хозяином которого является западный подвид полевой мыши *Apodemus agrarius agrarius* [3]. На юге европейской части России ГЛПС регистрируется ежегодно и проявляется спорадической заболеваемостью с периодическими эпидемическими подъемами (рисунок). В Волгоградской области заболеваемость ГЛПС обусловлена вирусом ГЛПС-ПУУ [9], а в Причерноморском регионе – ГЛПС ДОБ-Ар, циркулирующим в пределах ареала кавказской мыши *Sylvaemus ponticus* [10]. ГЛПС в Краснодарском крае регистрируется с 80-х годов прошлого столетия, а наличие природного очага хантавирусной инфекции в субтропической зоне края подтверждено сравнительно недавно [10–12].

На территории Республики Крым выявлена циркуляция вируса ГЛПС Тула (при исследовании РНК хантавируса, выделенных от полевок *Microtus obscurus*, отловленных в Бахчисарайском районе) [13], в Ставропольском крае специалистами Ставропольского противочумного института также подтверждена циркуляция вируса ГЛПС Тула, а в Астраханской области и Республике Калмыкия установлено существование природных очагов хантавируса Добрава [14].

Если за 10 последних лет (2009–2018 гг.) в целом по Российской Федерации зарегистрировано 71623 случая ГЛПС, то на юге европейской части страны выявлено 152 случая, то есть 0,21 % от количества случаев ГЛПС в России за указанный период, что, однако, не снижает эпидемической значимости этой болезни в данном регионе.

ГЛПС в южных субъектах Российской Федерации проявляется в виде спорадической заболеваемости (включая заносные случаи) с ежегодными колебаниями от 4 до 25 случаев, пики числа заболеваний отмечены в 2009 г. (25 случаев), 2013 г. (24), 2014 г. (17) и 2018 г. (17).

Практически все больные ГЛПС проживали в Волгоградской области (44 случая) или в Краснодарском крае (98 случаев), расположенных на территории двух различных природных очагов: в северной части региона – Волгоградская область и в южной – Краснодарский край и Республика Адыгея, где с 2014 г. выявлено 4 случая заболевания (рисунок).

Наиболее обширная площадь природного очага ГЛПС на юге России – на территории Волгоградской области. Эпидемиологически наиболее активной является северная часть, примыкающая к Саратовской области, где расположен активный очаг ГЛПС. Заболевания в последние 10 лет здесь ежегодно регистрировали в Руднянском, Жирновском и Еланском районах, а также в 2013 и 2015 гг. – в Ольховском районе, относящемся к центральной

части Волгоградской области. При эпизоотологическом обследовании маркеры вируса ГЛПС обнаружены на территории 17 административных районов (из 33), расположенных в северной и центральной частях области. Положительные результаты ежегодно получали при исследовании органов рыжей полевки *M. glareolus*, малой лесной *Sylvaemus uralensis*, желтогорлой *S. flavicollis*, полевой *A. agrarius* и домашней *Mus musculus* мышью, иногда других грызунов. Антиген вируса методом ИФА выявляли в 4,2–18,7 % исследованных проб. Методом ПЦР подтверждена циркуляция вируса на территории 12 административных районов Волгоградской области.

Во всех случаях ГЛПС, выявленных и зарегистрированных в Краснодарском крае в 2013–2018 гг., при условии заражения на территории края, инфицирование больных произошло в предгорной и горной зонах западной его части. Некоторые зарегистрированные случаи заболевания были квалифицированы как заносные из Республики Башкирия, Кировской, Рязанской, Самарской и Ленинградской областей. Заболевания с местным заражением инфекцией в 41 % регистрировались в городе-курорте Сочи, в 16 % – в Апшеронском районе, в 14,3 % – в городе-курорте Геленджике.

В Республике Адыгея также регистрировали спорадическую заболеваемость ГЛПС в 2014, 2015, 2017 и 2018 гг. (по одному случаю).

Эпизоотологический мониторинг свидетельствовал об активной циркуляции хантавируса в природных биотопах предгорной и горнолесной зон Краснодарского края и Республики Адыгея. Антиген хантавируса методами ИФА и РНИФ выявляли ежегодно в 6,4–17,8 % исследованных проб из органов кавказской *S. ponticus*, малой лесной *S. uralensis* и полевой *A. agrarius* мышей, обыкновенной *M. arvalis* и кустарниковой полевок *M. majori*. Циркуляция вируса подтверждена также выявлением его РНК в пробах органов грызунов.

В Ставропольском крае случаи заболевания ГЛПС не регистрируются. За анализируемый период только в 2012 г. выявлен один больной, заразившийся



Эпидемические проявления ГЛПС на юге России в 2009–2018 гг.

Epidemic manifestations of HFRS in the south of the European part of Russia, 2009–2018

за пределами края. Однако почти ежегодно антиген вируса выявляется в 3,2–4,5 % исследованных проб органов грызунов, а РНК вируса – в 1,9–2,4 % проб (песчанка гребенщикова *Meriones tamariscinus*, полевки обыкновенная *M. arvalis*, общественная *M. socialis* и водяная *Arvicola amphibius*, мыши домовая *M. musculus*, полевая *A. agrarius*, степная *S. witherbyi*, малая лесная *S. uralensis*). Методом ПЦР циркуляция вируса подтверждена в юго-западной части края – в Предгорном (г. Ессентуки), Кочубеевском (г. Невинномысск), Шпаковском, Труновском, Красногвардейском районах, а также в центральной части – в Новоселицком районе.

В отдельные годы регистрировались единичные случаи ГЛПС в республиках Ингушетия (2012), Калмыкия (2014), Крым (2017), Дагестан (2017), в Ростовской области (2018), эпидемиологически не связанные с возможностью местного заражения и квалифицированные как заносные. Больные местом своего инфицирования считали другие регионы Российской Федерации – республики Мордовия и Бурятия, а также Кировская область.

При эпизоотологическом обследовании территории республик Ингушетия, Дагестан и Кабардино-Балкарской Республики циркуляция хантавируса не выявлена. Единичные положительные результаты в ИФА на антиген хантавируса получены в Ростовской и Астраханской областях, в Республике Калмыкия.

В Республике Крым при отсутствии местных случаев заболевания ГЛПС РНК хантавируса обнаружена в 2014 г. в одной пробе мыши степной *S. witherbyi* в Симферопольском районе. В 2016 г. антиген вируса методом ИФА выявлен в 3,3 % исследованных проб органов мыши степной *S. witherbyi*, белозубки малой *Crocidura suaveolens*, полевки общественной *M. socialis*, мыши домовой *M. musculus*, отловленных на территории юго-восточной части Крыма – Кировского, Ленинского и Советского районов, а также в окрестностях Алушты.

Согласно данным карт эпидемиологического обследования очага инфекционного заболевания, предоставленным Управлениями Роспотребнадзора по Волгоградской области, Краснодарскому краю и Республике Адыгея, за анализируемый период 78,6 % от общего числа больных ГЛПС-ПУУ (Волгоградская область) являлись сельскими жителями, среди больных ГЛПС-ДОБ-Ар (Краснодарский край и Республика Адыгея) официально сельские жители составляли только 28,2 %, однако следует учитывать особенности Причерноморского региона, где на территории городов-курортов Сочи, Геленджик, Анапа и городского округа Новороссийск расположено множество поселений, где люди в основном проживают в домах частной застройки, имеют приусадебные и дачные участки, окруженные лесной зоной. В обеих группах преимущественно болели мужчины, при этом среди больных ГЛПС-ПУУ мужчин было в 7 раз больше, чем женщин, а среди больных ГЛПС-ДОБ-Ар – в 2,5 раза.

Заболевания ГЛПС в обеих группах регистрировали в течение всего года. Число случаев ГЛПС-ПУУ было больше в январе (21,4 % случаев), феврале и ноябре (по 14,3 %). Заражение вирусом ГЛПС-ДОБ-Ар чаще происходило в ноябре (18,2 % случаев), октябре и июле (по 10,7 %).

Лица, инфицированные вирусом ГЛПС-ДОБ-Ар, заболевание, как правило, связывали с нахождением в природных условиях (работа или отдых), 8 % – при контактах с грызунами в природных условиях. В то же время заражение больных вирусом ГЛПС-ПУУ происходило, главным образом, при контактах с грызунами (67 % всех случаев), зерном или кормами (20 %), и только 13 % заболевших связывают инфицирование с пребыванием в условиях природных биотопов.

В обеих группах превалировала среднетяжелая форма заболевания – в 81,3 % зарегистрированных случаев заболевания, обусловленных ГЛПС-ПУУ, и в 74,4 % случаях, вызванных ГЛПС-ДОБ-Ар. Тяжелые клинические формы заболевания в два раза чаще наблюдались при заражении вирусом ГЛПС-ДОБ-Ар, чем при заражении вирусом ГЛПС-ПУУ (в 25,6 и 12,5 % от общего числа случаев соответственно). Выявленные в Республике Адыгея в разные годы все четыре случая болезни протекали в тяжелой форме. Заболевание в легкой форме зарегистрировано лишь однажды в Волгоградской области, что, прежде всего, связано с низкой диагностикой случаев ГЛПС.

Так, предварительный диагноз ГЛПС при поступлении в стационары Волгоградской области был поставлен 56,3 % больным, а в Краснодарском крае и в Республике Адыгея – только 31,7 % больных, хотя очевидно, что раннее обращение за медицинской помощью, госпитализация в стационар и своевременно назначенное лечение влияют как на тяжесть течения инфекционного процесса, так и на исход заболевания.

За десятилетний период наблюдения летальный исход на юге России имели два случая ГЛПС – в 2012 г. (Волгоградская область) и в 2017 г. (Краснодарский край). Однако больная, проживающая в Сочи, местом своего заражения считает Республику Коми, так что заболевание не могло быть вызвано вирусом ГЛПС-ДОБ-Ар.

Таким образом, на юге европейской части России циркуляция хантавируса подтверждена на территории Волгоградской и Астраханской областей, Ставропольского и Краснодарского краев, республик Адыгея, Калмыкия и Крым.

Поскольку природные очаги, ассоциированные с разными хантавирусами, следует рассматривать отдельно, классифицируя их по вирусному агенту или основному хозяину [15], в южном регионе существуют соответственно и различные природные очаги ГЛПС.

Однако несомненное эпидемиологическое значение имеют две географически и генетически изолированные группы хантавируса (то есть два при-

родных очага), циркулирующие в Волгоградской области и в горно-предгорной зоне Краснодарского края и Республики Адыгея, отличающиеся основным резервуарным хозяином вируса (рыжая полевка *M. glareolus* и кавказская мышь *S. ponticus*) и имеющие различия.

Таким образом, на территории европейского юга России расположены природные очаги ГЛПС разного типа, отличающиеся по виду циркулирующих в них хантавирусов – ГЛПС-ПУУ, ГЛПС-ДОБ, ГЛПС Тула и ГЛПС-ДОБ-Ар, их основным резервуаром (мелкие млекопитающие разных видов) и эпидемической значимостью. Высоким эпидемическим потенциалом на юге России обладают природные очаги, обусловленные циркуляцией вирусов ГЛПС-ПУУ и ГЛПС-ДОБ-Ар, расположенные соответственно на территории Волгоградской области и горно-предгорной зоны Краснодарского края и Республики Адыгея и различающиеся клинико-эпидемиологическими характеристиками, наиболее значимой из которых является дифференциация по тяжести клинического течения и проявляющаяся большим количеством тяжелых форм заболеваний, вызванных ГЛПС-ДОБ-Ар. Остальная территория юга России, где циркулируют другие хантавирусы, имеет низкий эпидемический потенциал.

Современной особенностью ГЛПС на европейском юге России является регистрируемая в последние 10 лет относительно низкая для этой болезни летальность – на территории природного очага ГЛПС-ПУУ зарегистрирован один случай со смертельным исходом в Волгоградской области, на территории же природного очага ГЛПС-ДОБ-Ар летальных случаев заболевания, вызванных этим вирусом, не зарегистрировано. Несмотря на высокую эпидемиологическую опасность ГЛПС, в медицинских организациях субъектов ЮФО, эндемичных по этим инфекционным болезням, при первичном обращении больных предварительный диагноз ГЛПС ставится недостаточно часто. Предварительный диагноз ГЛПС был поставлен 56,3 % больных Волгоградской области и 31,7 % больных в Краснодарском крае и Республике Адыгея.

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

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-75-20088 «Создание опирающейся на данные дистанционного зондирования Земли методологии анализа и прогнозирования влияния климатических и экологических факторов на заболеваемость природно-очаговыми инфекциями») – исполнители Платонов А.Е., Дубянский В.М., Прислегина Д.А.

#### Список литературы

1. Компанец Г.Г., Иунихина О.В., Потт А.Б., Крылова Н.В. Вирусные геморрагические лихорадки в странах азиатской части АТР: эпидемиология, перспективы лечения и профилактики. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2019; 3:11–8. DOI:

10.17238/PmJ1609-1175.2019.3.11–18.

2. Савицкая Т.А., Трифонов В.А., Исаева Г.Ш., Решетникова И.Д., Пакскина Н.Д., Серова И.В., Иванова А.В., Сафронов В.А., Попов Н.В. Обзор современной эпидемиологической обстановки по заболеваемости геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в мире и прогноз заболеваемости на территории Российской Федерации в 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 2:30–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-30-36.

3. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Бернштейн А.Д., Окулова Н.М., Коротина Н.А., Транквиловский Д.В., Морозов В.Г., Юничева Ю.В., Завора Д.Л., Баловнева М.В., Соцкова С.Е., Мутных Е.С., Смирнова М.С., Леонович О.А., Шевелев А.Б., Малкин Г.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в России – проблема XXI века. *Вестник Российской академии естественных наук*. 2012; 1:48–54.

4. Жигальский О.А., Бернштейн А.Д., Кшняев И.А., Апекина Н.С. Экологические механизмы функционирования активных европейских очагов ГЛПС. Прогноз заболеваемости. *Экология*. 2013; 3:237–40. DOI: 10.7868/S0367059713020121.

5. Тарасов М.А., Гаранина С.Б., Кресова У.А., Поршаков А.М., Ляпин М.Н., Рябова А.В., Толоконникова С.И., Шилов М.М., Удодов А.И., Григорьева Г.В., Яковлев С.А. Критерии оценки отличий разных типов очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Очаги ГЛПС в различных биотопах типичной степи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; 3:67–72.

6. Иванова А.В., Попов Н.В., Куклев Е.В., Адамов А.К., Щербак С.А. Обзор эпидемиологической обстановки по геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС) на территории Российской Федерации за 1990–2015 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 2:16–21.

7. Klempa V., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste V., Aniskin V., Meisel H., Denys C., Koivogui L., ter Meulen J., Krüger D. Hantavirus in African Wood Mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5):838–40. DOI: 10.3201/eid1205.051487.

8. Иванис В.А., Попов А.Ф., Томилка Г.С., Фигурнов В.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом – проблема здравоохранения настоящего времени. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015; 1:21–5.

9. Ткаченко Е.А., Бернштейн А.Д., Дзагурова Т.К., Морозов В.Г., Слонова Р.А., Иванов Л.И., Иванова Л.И., Транквиловский Д.В., Крюгер Д. Актуальные проблемы современного этапа изучения геморрагической лихорадки с почечным синдромом в России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013; 1:51–8.

10. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Бернштейн А.Д., Окулова Н.М., Коротина Н.А., Транквиловский Д.В., Морозов В.Г., Юничева Ю.В., Завора Д.Л., Баловнева М.В., Соцкова С.Е., Мутных Е.С., Смирнова М.С., Леонович О.А., Шевелев А.Б., Малкин Г.А. Современное состояние проблемы геморрагической лихорадки с почечным синдромом в России. *Национальные приоритеты России*. 2011; 2:18–22.

11. 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; 21(1):22–30. DOI: 10.18821/1560-9529-2016-21-1-22-30.

12. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Бернштейн А.Д., Коротина Н.А., Окулова Н.М., Мутных Е.С., Иванов А.П., Ишмухаметов А.А., Юничева Ю.В., Пиликова О.М., Морозов В.Г., Транквиловский Д.В., Городин В.Н., Бахтина В.А., Соцкова С.Е. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (история, проблемы и перспективы изучения). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15(3):23–34. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-3-23-34.

13. Яшина Л.Н., Зайковская А.В., Протопопова Е.В., Бабкин И.В., Мальшев Б.С., Товпинец Н.Н., Евстафьев И.Л. Хантавирус Тула на территории Крыма. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2015; 33(4):38–41.

14. Журавлев В.И., Гаранина С.Б., Кабин В.В., Шипулин Г.А., Платонов А.Е. Выявление нового природного очага вируса Добrava в Астраханской области. *Вопросы вирусологии*. 2008; 53(2):37–40.

15. Бернштейн А.Д., Гавриловская И.Н., Апекина Н.С., Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А. Особенности природной очаговости хантавирусных зоонозов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 2:5–13.

#### References

1. Kompanets G.G., Iunikhina O.V., Pott A.B., Krylova N.V. [Viral hemorrhagic fevers in the Asian part of Asian-Pacific region: epidemiology, potentials for specific treatment, and prevention]. *Tikhookeanskiy Meditsinskiy Zhurnal [Pacific Medical Journal]*. 2019; 3:11–8.

2. Savitskaya T.A., Trifonov V.A., Isaeva G.S., Reshetnikova

I.D., Pakschina N.D., Serova I.V., Ivanova A.V., Safronov V.A., Popov N.V. [Review of the current epidemiological situation on the incidence of hemorrhagic fever with renal syndrome in the world and forecast of the incidence for the territory of the Russian Federation in 2019]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 2:30–6.

3. Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Okulova N.M., Korotina N.A., Trankvilevskiy D.V., Morozov V.G., Yunicheva Yu. V., Zavora D.L., Baloyneva M.V., Sotskova S.E., Mutnikh E.S., Smirnova M.S., Leonovich O.A., Shevelev A.B., Malkin G.A. [Hemorrhagic fever with renal syndrome in Russia – problem of XXI century]. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Estestvennykh Nauk [Bulletin of the Russian Academy of Natural Sciences]*. 2012; 1:48–54.

4. Zhigal'skiy O.A., Bernshtein A.D., Kshnyasev I.A., Apekina N.S. [Ecological mechanisms of function of active European HFRS foci]. *Ekologiya [Ecology]*. 2013; 3:237–40.

5. Tarasov M.A., Garanina S.B., Kresova U.A., Porshakov A.M., Lyapin M.N., Ryabova A.V., Tolokonnikova S.I., Shilov M.M., Udovikov A.I., Grigorieva G.V., Yakovlev S.A. [Criteria of difference evaluation for various types of hemorrhagic fever with renal syndrome foci. HFRS foci in various biotopes of typical barrens]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2015; 3:67–72.

6. Ivanova A.V., Popov N.V., Kuklev E.V., Adamov A.K., Scherbakova S.A. [Review of epidemiologic situation on hemorrhagic fever with renal syndrome (HERS) in Russian Federation in 1990–2015]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2017; 2:16–21.

7. Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Denys C., Koivogui L., ter Meulen J., Krüger D. Hantavirus in African Wood Mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5):838–40. DOI: 10.3201/eid1205.051487.

8. Ivanis V.A., Popov A.F., Tomilka G.S., Figurnov V.A. [Hemorrhagic fever with renal syndrome – a healthcare problem of present]. *Tikhookeanskiy Meditsinskiy Zhurnal [Pacific Medical Journal]*. 2015; 1:21–5.

9. Tkachenko E.A., Bernshtein A.D., Dzagurova T.K., Morozov V.G., Slonova R.A., Ivanova L.I., Trankvilevskiy D.V., Kryuger D. [Actual problems of the modern stage of the study of hemorrhagic fever with renal syndrome in Russia]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2013; 1:51–8.

10. Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Okulova N.M., Korotina N.A., Trankvilevskiy D.V., Morozov V.G., Yunicheva Yu.V., Zavora D.L., Baloyneva M.V., Sotskova S.E., Mutnikh E.S., Smirnova M.S., Leonovich O.A., Shevelev A.B., Malkin G.A. [Present state of the hemorrhagic fever with renal syndrome problem in Russia]. *Natsional'nye Prioritety Rossii [National Priorities of Russia]*. 2011; 2(5):18–22.

11. Tkachenko E.A., Morozov V.G., Dzagurova T.K.,

Yunicheva Yu.V., Pilikova O.M., Zavora D.L., Ishmukhametov A.A., Gorodin V.N., Bakhtina V.A., Zagidullin I.M., Sotskova S.E. [Etiologic and clinical epidemiological features of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in the Krasnodar krai]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2016; 21(1):22–30.

12. Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Korotina N.A., Okulova N.M., Mutnikh E.S., Ivanov A.P., Ishmukhametov A.A., Yunicheva Yu. V., Pilikova O.M., Morozov V.G., Trankvilevskiy D.V., Gorodin V.N., Bakhtina V.A., Sotskova S.E. [Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (history, problems and research perspectives)]. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2016; 3:23–34.

13. Yashina L.N., Zaykovskaya A.V., Protopopova E.V., Babkin I.V., Malyshev B.S., Tovpinets N.N., Evstafiev I.L. [Hantavirus Tula in the Crimea]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2015; 4:38–41.

14. Bernshtein A.D., Gavrilovskaya I.N., Apekina N.S., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A. [Features of natural foci of hantavirus zoonosis]. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2010; 2:5–13.

15. Zhuravlev V.I., Garanina S.B., Kabin V.V., Shipulin G.A., Platonov A.E. [Identification of a new natural focus of the Dobrava virus in the Astrakhan region]. *Voprosy Virusologii [Questions of Virology]*. 2008; 54(2):37–40.

#### Authors:

Maletskaya O.V., Taran T.V., Prislegina D.A., Dubynskiy V.M., Volynkina A.S., Vasilenko N.F., Tokhov Yu.N., Tsapko N.V. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Platonov A.E. Central Research Institute of Epidemiology. 3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russian Federation. E-mail: crie@pcr.ru.

#### Об авторах:

Малецкая О.В., Таран Т.В., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Вольнкина А.С., Василенко Н.Ф., Тохов Ю.Н., Цанко Н.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Платонов А.Е. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. Российская Федерация, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а. E-mail: crie@pcr.ru.

Поступила 30.09.19.

Отправлена на доработку 28.10.19.

Принята к публ. 06.11.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-85-91

УДК 616-022(470)

С.А. Портенко, А.С. Абдрашитова, Н.Е. Щербакова, П.С. Ерохин, Я.М. Краснов, Н.П. Гусева,  
Н.А. Шарапова, С.А. Щербакова, В.В. Кутырев

## РАСШИРЕННОЕ ИЗУЧЕНИЕ ШТАММОВ ЛЕГИОНЕЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ВО ВРЕМЯ ПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2013–2014 гг.

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

**Цель работы** – провести расширенное изучение штаммов легионелл, выделенных из эпидемиологически значимых объектов окружающей среды во время подготовки и проведения массовых мероприятий. **Материалы и методы.** В работе использованы 53 штамма *Legionella pneumophila*, выделенные из эпидемиологически значимых объектов окружающей среды на территориях ряда субъектов Российской Федерации в 2013–2014 гг. во время подготовки и проведения массовых мероприятий (XXVII Всемирная летняя Универсиада, Казань; XXII Олимпийские зимние игры и XI Паралимпийские зимние игры, Сочи; Летняя оздоровительная кампания в 2014 г., Республика Крым; IV Каспийский саммит, Астрахань, 2014 г.). Изучение штаммов осуществляли с помощью методов мультилокусного секвенирования, времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF-MS) и атомно-силовой микроскопии. Типирование штаммов легионелл методом мультилокусного секвенирования проводили в соответствии с алгоритмом Европейской исследовательской группы по легионеллезу Sequence-Based Typing protocol for epidemiological typing of *L. pneumophila*. **Результаты и обсуждение.** На территории Республики Крым и городов Казань, Сочи, Астрахань выделены и охарактеризованы штаммы возбудителя легионеллеза *L. pneumophila*. По результатам слайд-агглютинации 17 штаммов *L. pneumophila* отнесены к 1-й серогруппе, 37 – к 2–14-й серогруппам. На основании данных, полученных методом мультилокусного секвенирования в соответствии с алгоритмом Европейской рабочей группы по надзору за легионеллезом, определены аллельные профили всех изученных штаммов *L. pneumophila*, установлена их принадлежность к семи сиквенс-типам. Методом времяпролетной масс-спектрометрии идентифицированы штаммы легионелл, изучены их белковые профили, сформирована база данных. С помощью метода сканирующей зондовой микроскопии получена информация о морфологии клеток 18 штаммов легионелл и особенностях их поверхностных структур. Таким образом, получены данные о молекулярно-генетических, протеомных и морфометрических особенностях штаммов возбудителя легионеллеза, циркулирующих в эпидемиологически значимых объектах на территории Российской Федерации.

**Ключевые слова:** легионеллез, массовые мероприятия, *Legionella pneumophila*, мониторинг, бактериологический метод, мультилокусное секвенирование, времяпролетная масс-спектрометрия, атомно-силовая микроскопия.

Корреспондирующий автор: Портенко Светлана Анатольевна, e-mail: portenko\_sa@microbe.ru.

Для цитирования: Портенко С.А., Абдрашитова А.С., Щербакова Н.Е., Ерохин П.С., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарапова Н.А., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Расширенное изучение штаммов легионелл, выделенных из объектов окружающей среды во время подготовки и проведения массовых мероприятий в Российской Федерации в 2013–2014 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:85–91. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-85-91

S.A. Portenko, A.S. Abdrashitova, N.E. Shcherbakova, P.S. Erokhin, Ya.M. Krasnov, N.P. Guseva,  
N.A. Sharapova, S.A. Shcherbakova, V.V. Kutyrev

## Extensive Studies of *Legionella* Strains Isolated from the Environmental Objects during Preparation and Holding of Mass Events in the Russian Federation in 2013–2014

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

**Abstract. Objective of the work** was to conduct an extended study of *Legionella* strains isolated from epidemiologically significant environmental objects during the preparation and conduct of mass events in the territory of the Russian Federation in 2013–2014. **Materials and methods.** Studied were 53 strains of *Legionella pneumophila*, isolated from epidemiologically significant objects during the preparation and conduct of a number of mass events (ME): XXVII World Summer Universiade, XXII Olympic Winter Games and XI Paralympic Winter Games, Sochi; Summer Health Promotion Campaign in 2014, Republic of Crimea; IV Caspian Summit, Astrakhan, 2014. Strains were analyzed using multilocus sequencing, time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF-MS) and atomic force microscopy. *Legionella* strains were typed by multilocus sequencing in accordance with the algorithm of the European Legionellosis Research Group “Sequence-Based Typing protocol for epidemiological typing of *L. pneumophila*”. **Results and discussion.** Strains of *L. pneumophila*, legionellosis agent, were isolated in the territory of the Republic of Crimea, Moscow, Kazan, Sochi, Astrakhan and characterized. According to the results of slide agglutination, 17 *L. pneumophila* strains were assigned to 1 serogroup, 37 – to 2–14 serogroups. Based on the data obtained by multilocus sequencing, in accordance with the algorithm of the European Working Group on Legionellosis Surveillance, allelic profiles of all the studied *L. pneumophila* strains were identified; their belonging to 7 sequence types was established. Using the method of time-of-flight mass spectrometry, legionella strains were characterized, their protein profiles were studied, and a database was formed. Using the method of scanning probe microscopy, information was obtained on the morphology of the cells of 18 legionella strains and the features of their surface structures. Using the methods of multilocus sequencing, time-of-flight mass

spectrometry, and atomic force microscopy, molecular-genetic, proteomic, and morphometric features of Legionellosis pathogen strains that circulate in epidemiologically significant sites in the Russian Federation were determined.

**Key words:** legionellosis, mass events, *Legionella pneumophila*, monitoring, bacteriological method, multilocus sequencing, time-of-flight mass spectrometry, atomic force microscopy.

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

**Corresponding author:** Svetlana A. Portenko, e-mail: portenko\_sa@microbe.ru.

**Citation:** Portenko S.A., Abdrashitova A.S., Shcherbakova N.E., Erokhin P.S., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., Shcherbakova S.A., Kutayev V.V. Extensive Studies of Legionella Strains Isolated from the Environmental Objects during Preparation and Holding of Mass Events in the Russian Federation in 2013–2014. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:85–91. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-85-91

Received 27.11.19. Accepted 03.12.19.

Portenko S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8334-9173>

Бактерии рода *Legionella* являются типичными представителями пресноводных экосистем, при этом количество этих микроорганизмов в природных условиях незначительно и не представляет опасности для человека [1]. В искусственных водных системах (водоснабжения и охлаждения воздуха, бассейнах и т.д.) создаются более благоприятные условия для роста и размножения легионелл, что приводит к накоплению возбудителя в высокой концентрации, представляющей опасность для заражения человека [2].

Ежегодно в различных странах мира регистрируются эпидемические вспышки легионеллеза, связанные с системами водоснабжения. В России крупная вспышка легионеллезной инфекции зарегистрирована летом 2007 г. в городе Верхняя Пышма, число госпитализированных составило 202 человека, из них у 74 лабораторно подтвержден диагноз «легионеллез», в том числе у 4 пациентов – смертно [3].

Основными факторами передачи легионеллезной инфекции являются мелкодисперсный водный аэрозоль и вода, контаминированные возбудителем, поэтому системы кондиционирования и водоснабжения в отелях, аквапарках, на спортивных и других объектах могут представлять опасность для заражения людей. В странах Европейского союза наблюдается подъем заболеваемости легионеллезом с 2013 по 2017 год: от 1,2 случаев на 100 тыс. в 2013 г. до 1,8 в 2017 г. В 2017 г. количество случаев этой инфекции увеличилось на 30 % по сравнению с 2016 г., зафиксировано 9238 случаев легионеллеза, связанного с поездками – travel-associated Legionnaires' disease (TALD), из которых 8624 (93 %) подтверждены лабораторно [4]. По данным отечественных исследователей, на территориях таких субъектов Российской Федерации, как Москва, Московская область, Белгород, Нижний Новгород, Омск, Самара, Тверская и Свердловская области, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, уровень контаминации *Legionella pneumophila* систем горячего водоснабжения превышает 90 % [5, 6]. Учитывая, что методов специфической профилактики легионеллезной инфекции не разработано, единственным подходом к предотвращению вспышек этого заболевания можно назвать мониторинг возбудителя в эпидемиологически значимых объектах окружающей среды и своевременное проведение профилактических мероприятий.

Перечень, порядок и периодичность обследования объектов, а также критерии оценки уровня их контаминации легионеллами регламентированы рядом нормативно-методических документов (НМД): СП 3.1.2.2626-10, МУК 4.2.2217-07 и МУ 3.1.2.2412-08. Продолжительность культурального метода, применяющегося в этих целях, может достигать 10 сут, а идентификация выделенных культур – до 2–3 сут. В последние годы для идентификации штаммов легионелл широкое применение получили методы MALDI-TOF масс-спектрометрии и мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) [7–9].

Данные подходы позволяют не только определить таксономическую принадлежность патогена, но и выявить отличия между штаммами возбудителя, в том числе и в зависимости от их географической принадлежности (места выделения).

**Цель** исследования – провести расширенное изучение штаммов легионелл, выделенных из эпидемиологически значимых объектов окружающей среды на территории Российской Федерации во время подготовки и проведения массовых мероприятий с помощью методов мультилокусного секвенирования, времяпролетной масс-спектрометрии и атомно-силовой микроскопии.

## Материалы и методы

В работе использованы 53 штамма *L. pneumophila*, выделенные из систем горячего водоснабжения на территориях ряда субъектов Российской Федерации в 2013–2014 гг. во время подготовки и проведения массовых мероприятий (ММ): XXVII Всемирная летняя Универсиада в Казани; XXII Олимпийские зимние игры и XI Паралимпийские зимние игры в Сочи [10]; Летняя оздоровительная кампания в 2014 г. в Республике Крым [11]; IV Каспийский саммит в Астрахани, 2014 г.

Хранение выделенных культур легионелл осуществляли при температуре -20 °С в 1 % протеозопептонном бульоне, рН 6,9 (Himedia, Индия) с добавлением 50 % глицерина (Panreac, Испания). Штаммы легионелл культивировали в соответствии с МУК 4.2.2217-07, применяли питательные среды, зарегистрированные в установленном порядке на территории Российской Федерации: забуференный угольно-дрожжевой агар с ростовой и селек-

тивной добавками (Oxoid, Великобритания; Conda, Испания). Определение принадлежности легионелл к серогруппе осуществляли методом латекс-агглютинации с использованием набора Legionella latex test (Oxoid, Великобритания).

Для экстракции геномной ДНК штаммов *L. pneumophila* применяли набор «ДНК-сорб-В» (ООО «Интерлабсервис», Россия). Амплификацию и секвенирование фрагментов семи генов *L. pneumophila* (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *tompS*, *proA* и *neuA*) проводили в соответствии с протоколом типирования штаммов *L. pneumophila* методом мультилокусного секвенирования – Sequence-Based Typing (SBT) Европейской рабочей группы по надзору за легионеллезом (EWGLI, [www.ewgli.org]). Этот протокол является международным стандартом типирования штаммов легионелл. Он нашел широкое применение при изучении штаммов *L. pneumophila*, выделенных из объектов окружающей среды [12].

Секвенирование полученных фрагментов ДНК выполняли на генетическом анализаторе ABI 3500xL (Applied Biosystems, США), для анализа полученных последовательностей легионелл и их выравнивания применяли программу MEGA 7.0. Для определения аллельного профиля и сиквенс-типа (ST) изучаемых штаммов использовали базу данных EWGLI SBT на сайте www.ewgli.org.

Подготовку образцов для исследования методом MALDI-ToF-MS проводили в соответствии с МР 4.2.0089-14, используя для экстракции белков метод прямого нанесения образцов на мишень. Сбор исходных спектров анализируемых образцов проводили на масс-спектрометре Microflex™ LT (Bruker Daltonics, Германия). Учет и интерпретацию результатов проводили в автоматическом режиме с помощью программного обеспечения «MALDI Biotyper 3.0 RTC» (Bruker Daltonics, Германия), сравнивая полученные спектры с референсными. Учет и интерпретацию результатов проводили в автоматическом режиме. По окончании процесса идентификации программа отображала результат, приводя наиболее релевантную исходному спектру таксономическую единицу базы данных с указанием значения коэффициента соответствия (Score Value).

Подготовку культур легионелл к исследованиям с помощью метода АСМ проводили в соответствии с МУ 1.3.3103-13. Морфометрический анализ клеток легионелл осуществляли методом сканирующей зондовой микроскопии (полуконтактная атомно-силовая микроскопия) с использованием сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO (НТ-МДТ, Россия) в режиме прерывистого контакта следующими методами: полуконтактным и рассогласования. Значения основных параметров сканирования определяли в соответствии с методическими рекомендациями «Оптимизация параметров сканирования микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии» (утверждены директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» 22.10.2013 г.).

Обработку изображений проводили в программе Nova (ООО «НТ-МДТ СИ», Россия).

## Результаты и обсуждение

При исследовании 53 штаммов *L. pneumophila* в реакции латекс-агглютинации (набор для идентификации легионелл и определения серогрупп *L. pneumophila* Legionella latex test, Oxoid) 16 культур отнесены к 1 серогруппе, 37 – к 2–14 серогруппам.

Анализ данных 16 штаммов *L. pneumophila* 1 серогруппы (1 Sg) выявил у семи штаммов аллельный профиль 1, 4, 3, 1, 1, 1, 1, что определяет их принадлежность к ST-1. Штаммы *L. pneumophila* 1 Sg ST-1 обнаружены на территории Республики Крым, а также в городах Астрахань и Сочи. По результатам исследований пяти штаммов *L. pneumophila* (Астрахань) отнесены к генотипу ST-345 (аллельный профиль 6, 10, 19, 3, 19, 4, 11), четыре штамма *L. pneumophila* (Республика Крым) – к генотипу ST-967 (аллельный профиль 2, 10, 3, 3, 9, 14, 3). Для одного из штаммов *L. pneumophila* 1 Sg, выделенных из объектов окружающей среды в Астрахани (аллельный профиль 6, 10, 19, 3, 19, 1, 11), сиквенс-тип не определен (таблица).

При изучении 37 штаммов *L. pneumophila* 2-14 Sg выявлена их принадлежность к семи сиквенс-типам. К ST-114 (аллельный профиль 3, 6, 1, 6, 14, 11, 9) отнесены 7 штаммов (1 – Сочи, 6 – Казань); к ST-366 (аллельный профиль 2, 10, 3, 3, 9, 4, 6) – 9 штаммов (6 – Сочи, 3 – Республика Крым); к ST-87 (аллельный профиль 2, 10, 3, 28, 9, 4, 13) – 3 штамма, Сочи; к ST-967 (2, 10, 3, 3, 9, 14, 3) – 10 штаммов, Республика Крым. Для штаммов, выделенных в Сочи, для одного определен генотип ST-856 (аллельный профиль 5, 1, 22, 30, 6, 10, 1) и для еще одного – ST-698 (аллельный профиль 7, 10, 17, 3, 17, 11, 9). Для шести штаммов *L. pneumophila* 2-14 Sg, Астрахань, имеющих аллельный профиль 3, 6, 1, 6, 17, 11, 9, сиквенс-тип не определен, также как и для указанного выше штамма 1 Sg, выделенного на той же территории.

При исследовании 53 штаммов легионелл методом MALDI-ToF-MS установлена их принадлежность к виду *L. pneumophila*, при этом коэффициент соответствия Score Value для всех изученных штаммов находился в диапазоне 2,0–2,3, что свидетельствует о достоверности полученных результатов идентификации до вида. С использованием полученных данных проведен кластерный анализ изучаемых штаммов с референтными MSP штаммов, представленных в базе данных программы Bruker Daltonic, поддерживаемых в фондах Американской коллекции типовых культур (ATCC) и Германской коллекции микроорганизмов и культур клеток (DSM). В итоге кластеризации спектры распределились на две основные ветви дендрограммы, на одной из которых располагаются только штаммы из DSM коллекции, на второй – MSP штаммов легионелл, выделенных

Характеристика штаммов *L. pneumophila*, выделенных из систем горячего водоснабженияCharacteristics of *L. pneumophila* Strains Isolated from Hot Water Supply System

Номер штаммов <i>Legionella pneumophila</i> Strain No <i>Legionella pneumophila</i>	Серогруппа Serogroup	Алельный профиль <i>flaA</i> , <i>pilE</i> , <i>asd</i> , <i>mip</i> , <i>tompS</i> , <i>proA</i> , <i>neuA/MLST</i> <i>Allele Profile flaA, pilE, asd, mip, tompS,</i> <i>proA, neuA/MLST</i>	Сиквенс-тип Sequence-type	Наименование мероприятия, место выделения, год* Event, site of isolation, year*
0007, 0030, 0225, 0228, 0303 698/1	1	1, 4, 3, 1, 1, 1, 1	1	2
1067, 1068, 1081, 1082, 1083		6, 10, 19, 3, 19, 4, 11	345	3
700, 702, 703, 881		2, 10, 3, 3, 9, 14, 3	967	4
1084		6, 10, 19, 3, 19, 1, 11	н/о	3
0034		1, 4, 3, 1, 1, 1, 1	1	4
0177, 0209, 0444	2-14	2, 10, 3, 28, 9, 4, 13	87	2
1/52, 2/53, 3/54, 4/55, 5/56, 8/81		3, 6, 1, 6, 14, 11, 9	114	2
0004				1
0042, 0155, 0156, 0262, 0263, 0264		2, 10, 3, 3, 9, 4, 6	366	2
674, 676, 678				3
0169		7, 10, 17, 3, 17, 11, 9	698	2
0073		5, 1, 22, 30, 6, 10, 1	856	2
698/2-14, 699, 701, 882, 1045, 1046		2, 10, 3, 3, 9, 14, 3	967	3
1078, 1088, 1089		3, 6, 1, 6, 1, 11, 9	1999	4
1071		3, 6, 1, 6, 17, 11, 9	н/о	4
1072, 1073		3, 13, 1, 14, 9, 9, 3	н/о	4
1074, 1075, 1090		3, 6, 1, 6, 4, 11, 9	н/о	4

Примечание: н/о – не определяется; \*1 – XXVII Всемирная летняя универсиада в Казани, 2013 г.; 2 – XXII Олимпийские зимние игры и XI Паралимпийские зимние игры в Сочи, 2014 г.; 3 – Летняя оздоровительная кампания в 2014 г. в Республике Крым, Севастополь; 4 – IV Каспийский саммит в Астрахани, 2014 г.

Note: n/i – not identified, \*1 – XXVII World Summer Universiade in Kazan, 2013; 2 – XXII Olympic Winter Games and XI Paralympic Winter Games in Sochi, 2014; 3 – Summer Health Promotion Campaign, 2014 in the Republic of Crimea, Sevastopol; 4 – IV Caspian Summit, Astrakhan, 2014.

на территории России и из коллекции ATCC. Следует отметить, что спектры штаммов *L. pneumophila* ATCC 35251 TW VUN и ATCC 33216 TW VUN, а также два штамма из изученных нами (1067, Астрахань и 0030, Сочи) сформировали два отдельных кластера, соответственно, в пределах второй основной ветви. Остальные MSP штаммов легионелл распределились на дендрограмме по шести подгруппам, в четырех из которых, наряду со штаммами, выделенными на территории России, присутствуют штаммы из коллекции ATCC, а в двух – только спектры изучаемых нами штаммов (рис. 1).

Необходимо отметить, что использованная в работе база данных «MALDI Biotyper 3.0 RTC» не содержит последовательности штаммов *Legionella pneumophila*, выделенных на территории Российской Федерации. Полученные нами масс-спектры 53 штаммов легионелл использованы при формировании базы данных «Белковые профили масс-спектров штаммов *Legionella pneumophila* для программы MALDI Biotyper». Созданная база данных предназначена для работы с программным комплексом MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия), содержит совокупность упорядоченных значений белковых масс-спектров штаммов *L. pneumophila*, выделенных на территории России, и является дополнением к библиотеке референсных масс-спектров микроорганизмов III–IV групп патогенности Bruker Daltonics программы MALDI Biotyper.

Методом АСМ исследовано 18 штаммов *L. pneumophila* (Казань, Астрахань), для всех штам-

мов получены сходные значения линейных размеров и среднеарифметической шероховатости, которые варьировали в диапазонах  $(1,8 \pm 0,4) \times (0,3 \pm 0,07) \times (0,25 \pm 0,05)$  мкм и 15–30 нм (рис. 2).

Вопросы типирования *L. pneumophila* актуальны как при расследовании эпидемических вспышек легионеллеза, так и для характеристики штаммов, циркулирующих в эпидемиологически значимых объектах. Среди методов молекулярного типирования наиболее перспективным подходом для практического внедрения представляется мультилокусное секвенирование – SBT, характеризующееся высокой воспроизводимостью и дискриминирующей способностью. Исследование, проводимое с этой целью, включает изучение полиморфизма семи генов, кодирующих белковые структуры (*fla*, *pile*, *tompS*), фактор вирулентности (*mip*) и ферменты метаболизма *L. pneumophila* (*asd*, *proA*, *neuA*) [13].

Все изученные штаммы возбудителя легионеллеза принадлежали к девяти сиквенс-типам. Более половины культур отнесены к пяти генотипам: ST-967 – 10 штаммов, ST-366 – 9 штаммов, ST-1 и ST-114 – по 7 штаммов, ST-345 – 5 штаммов. Сиквенс-типы ST-87, ST-968, ST-856 и ST-1999 встречались реже – к каждому из них принадлежали от 3 до 1 из изученных штаммов *L. pneumophila*. При анализе полученных данных выявились определенные отличия в распространении генотипов возбудителя легионеллеза на разных территориях.

Так, при проведении XXVII Всемирной летней универсиады в Казани (2013 г.) из проб объектов

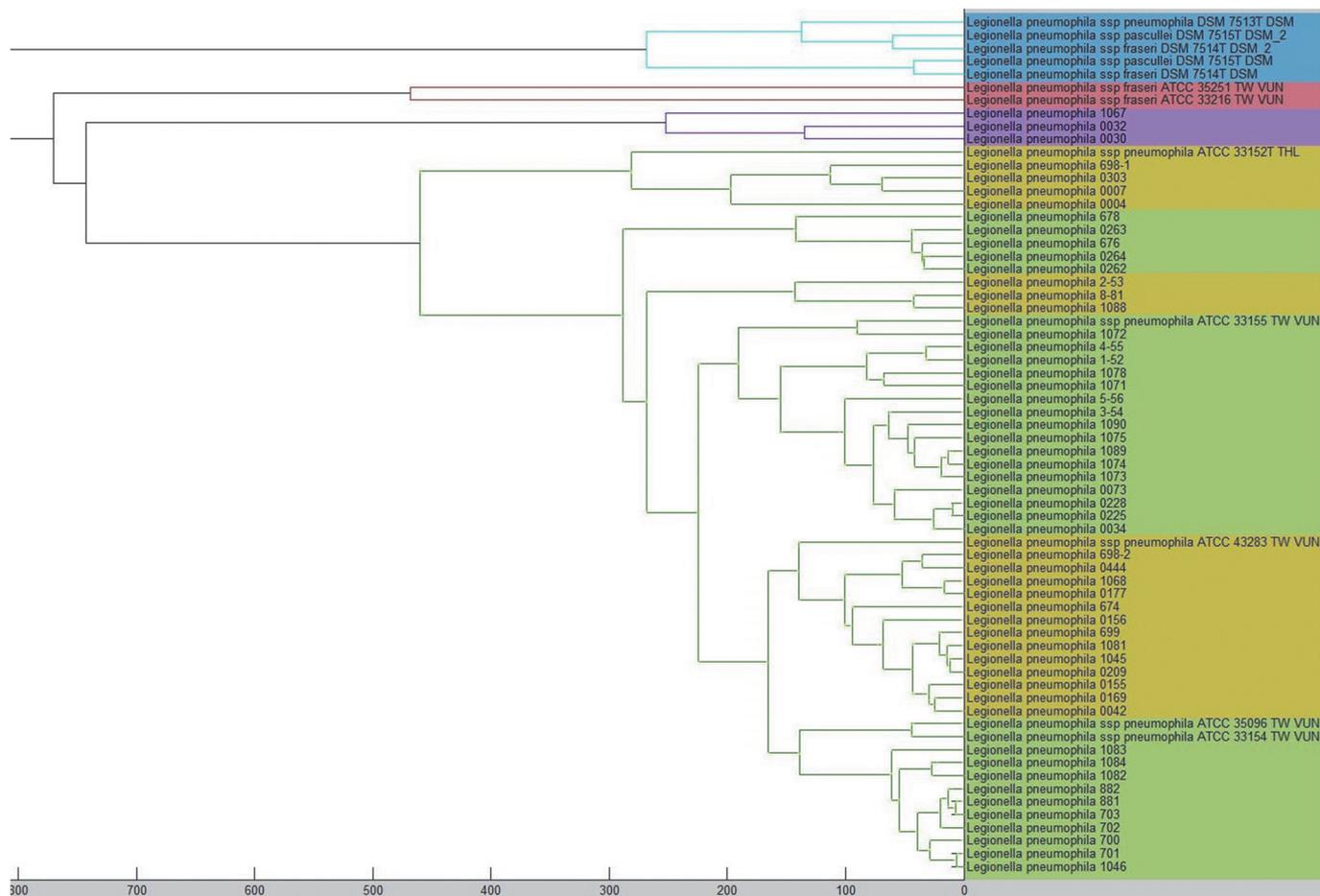


Рис. 1. MSP-дендрограмма белковых профилей штаммов *L. pneumophila*, выделенных на территории Российской Федерации и штаммов возбудителя легионеллеза из базы данных MALDI Biotyper 3.0 RTC

Fig. 1. MSP-dendrogram of protein profiles of *L. pneumophila* strains isolated in the territory of the Russian Federation and legionellosis agent strains from the database “MALDI Biotyper 3.0 RTC”

окружающей среды выделено шесть штаммов возбудителя легионеллеза, которые в 100 % случаев принадлежали к сиквенс-типу ST-114 (2–14 серогруппы). Тогда как из 18 штаммов *L. pneumophila*, выделенных во время подготовки и проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр в Сочи, по 6 культур легионелл относились к ST-1 и ST-366, 3 культуры – к ST-87 и по 1 культуре –

к ST-114, ST-698 и ST-856. При проведении летней оздоровительной кампании в 2014 г. в Республике Крым (Севастополь) выделено 14 штаммов возбудителя легионеллеза, из них 10 принадлежали к сиквенс-типу ST-967, 3 – к ST-366, 1 – к ST-1.

Особый интерес представляют результаты исследования культур *L. pneumophila*, изолированных в рамках подготовки и проведения IV Каспийского саммита в 2014 г. в Астрахани. Из 15 изученных штаммов возбудителя легионеллеза только в 8 случаях удалось определить сиквенс-тип: ST-345 (5 культур) и ST-1999 (3 культуры). Для остальных изолятов получены новые молекулярные профили, которые не представлены в базе данных EWGLI SBT.

В настоящее время база данных EWGLI SBT включает в себя последовательности более 13 тыс. штаммов *L. pneumophila*, из них около 4,5 тыс. – выделенных из объектов окружающей среды, а также более чем 2,8 тыс. сиквенс-типов легионелл. Однако полученные нами данные и сообщения ряда исследователей указывают на то, что не всегда с помощью данного алгоритма возможно получить полноценные данные и провести типирование штаммов *L. pneumophila*, что инициирует работу по созданию новых методических подходов в этом направлении.

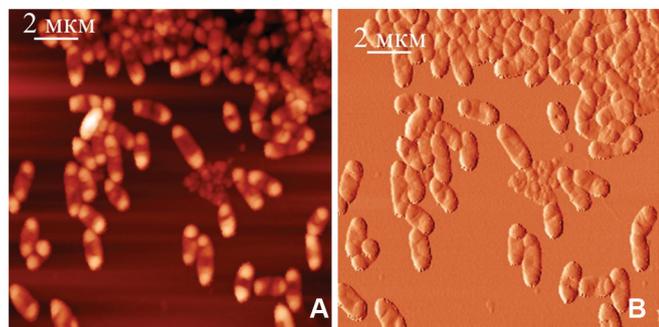


Рис. 2. AFM изображения штамма *L. pneumophila* 1089 (Астрахань, 2014 г.):

A – полуконтактный метод, B – метод рассогласования

Fig. 2. AFM visualization of *L. pneumophila* 1089 strain (Astrakhan, 2014):

A – tapping method; B – mismatch method

С помощью исследований методом MALDI-ToF-MS получены результаты, свидетельствующие об определенных отличиях белковых профилей штаммов *L. pneumophila* 1067 (Астрахань) и 0030 (Сочи), от остальных изученных штаммов, выделенных на территории Российской Федерации, а также от штаммов легионелл из коллекций ATCC и DSM. Сформированная нами база данных «Белковые профили масс-спектров штаммов *Legionella pneumophila* для программы MALDI Biotyper» является пополняемой и позволяет проводить идентификацию и сравнительный анализ масс-спектров штаммов *L. pneumophila*, циркулирующих в эпидемиологически значимых объектах на территории Российской Федерации.

Результаты морфометрического анализа, проведенного методом АСМ, позволили получить подробную информацию о морфологии клеток легионелл и особенностях их поверхностных структур.

Таким образом, на территории Казани, Сочи, Астрахани и Республики Крым из систем горячего водоснабжения выделены и охарактеризованы штаммы возбудителя легионеллеза *L. pneumophila*. С помощью методов мультилокусного секвенирования и АСМ получены данные о молекулярно-генетических и морфометрических свойствах штаммов возбудителя легионеллеза, циркулирующих в эпидемиологически значимых объектах на территории Российской Федерации. Получено свидетельство о регистрации базы данных «Белковые профили масс-спектров штаммов *Legionella pneumophila* для программы MALDI Biotyper» № 2018620064 от 11.01.2018 г.

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

#### Список литературы

- van Heijnsbergen E., de Roda Husman A.M., Lodder W.J., Bouwknegt M., Docters van Leeuwen A.E., Bruin J.P., Euser S.M., den Boer J.W., Schalk J.A.C. Viable *Legionella pneumophila* bacteria in natural soil and rainwater puddles. *J. Appl. Microbiol.* 2014; 117(3):882–90. DOI: 10.1111/jam.12559.
- Карпова Т.И., Тартаковский И.С. Особенности эпидемиологии и лабораторной диагностики легионеллеза. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2015; 4:51–8.
- Онищенко Г.Г., Лазикова Г.Ф., Чистякова Г.Г., Демина Ю.В., Никонов Б.И., Романенко В.В., Смирнова С.С., Терентьева Л.Н., Малоземова Т.Ю., Ирижепова О.В., Гаврилова Н.А., Аввакумова Н.П., Шитоева Е.В. Эпидемиологическая характеристика вспышки легионеллеза в г. Верхняя Пышма. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2008; 2:82–5.
- Legionnaires' disease Annual Epidemiological Report for 2017. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019. P. 2.
- Дронина Ю.Е., Тартаковский И.С., Садретдинова О.В., Карпова Т.И., Новокшона И.В., Груздева О.А., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н. Серологическая характеристика штаммов *Legionella pneumophila*, выделенных из потенциально опасных водных систем в Российской Федерации в 2007–2011 годах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2012; 2:23–28.
- Тартаковский И.С., Груздева О.А., Галстян Г.М., Карпова Т.И. Профилактика, диагностика и лечение легионеллеза. М.: Студия МДВ; 2013. 344 с.
- Dilger T., Melzl H., Gessner A. *Legionella* contamination in warm water systems: a species-level survey. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2018; 221(2):199–210. DOI: 10.1016/j.ijheh.2017.10.011.
- Dilger T., Melzl H., Gessner A.J. Rapid and reliable identification of waterborne *Legionella* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbiol. Methods.* 2016; 127:154–9. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.05.028.
- Zhan X.-Y., Zhu Q.-Y. Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolates from environmental water samples and clinical samples using a five-gene sequence typing and standard Sequence-Based Typing. *PLoS ONE.* 2018; 13(2):e0190986. DOI: 10.1371/journal.pone.0190986.
- Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Куличенко А.Н., Портенко С.А., Гуськов А.С., Почтарева Е.С., Савельева И.В., Вольнкина А.С., Савельев В.Н., Михайлова М.Е., Кузнецова И.В., Бобенко О.А., Ефременко Д.В., Казакова Е.С., Красовская Т.Ю., Куклев В.Е., Касьян И.А., Билько Е.А., Мицевич Е.В., Мицевич И.П., Платонов М.Е., Теймуразов М.Г., Полосенко О.В., Елдинова В.Е., Бойко Е.А., Малай В.И., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Николаевич П.Н., Бирюков В.А., Божко И.И., Щербина Л.И., Погудина О.А. Организация обследования и выявление возбудителя легионеллеза в объектах окружающей среды в период подготовки и проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр в Сочи. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2015; 2:50–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-50-53.
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Куличенко А.Н., Рязанова А.Г., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Дикова С.П., Вольнкина А.С., Лисицкая Я.В., Казакова Е.С., Портенко С.А., Красовская Т.Ю., Шарова И.Н., Куклев В.Е., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Карнаухов И.Г. Итоги работы СПЭБ Роспотребнадзора по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия в период летней оздоровительной кампании 2014 г. в Крымском федеральном округе. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2015; 4:45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-45-48.
- Gaia V., Fry N.K., Afshar B., Luck P.C., Meugnier H., Etienne J., Peduzzi R., Harrison T.G. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(5):2047–52. DOI: 10.1128/JCM.43.5.2047-2052.2005.
- Lück C., Fry N.K., Helbig J.H., Jarraud S., Harrison T.G. Typing methods for *Legionella*. In: Buchrieser C., Hilbi H., editors. *Legionella. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. NJ, Totowa: Humana Press; 2013. Vol. 954. P. 119–48. DOI: 10.1007/978-1-62703-161-5\_6.

#### References

- van Heijnsbergen E., de Roda Husman A.M., Lodder W.J., Bouwknegt M., Docters van Leeuwen A.E., Bruin J.P., Euser S.M., den Boer J.W., Schalk J.A.C. Viable *Legionella pneumophila* bacteria in natural soil and rainwater puddles. *J. Appl. Microbiol.* 2014; 117(3):882–90. DOI: 10.1111/jam.12559.
- Karpova T.I., Tartakovsky I.S. [Peculiarities of epidemiology and laboratory diagnosis of legionellosis]. *Infektsionnyye Bolezni. Novosti, Mneniya, Obucheniye [Infectious Diseases. News, Opinions, Training]*. 2015; 4:51–8.
- Onishechenko G.G., Lazikova G.F., Chistyakova G.G., Demina Yu.V., Nikonov B.I., Romanenko V.V., Smirnova S.S., Terentyeva L.N., Malozemova T.Yu., Irizhepova O.V., GavriloVA N.A., Avvakumova N.P., Shitoeva E.V. [Epidemiologic characteristic of Legionnaire's disease outbreak in town Verkhnyaya Pyshma]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2008; 2:82–5.
- Legionnaires' disease Annual Epidemiological Report for 2017. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019. P. 2.
- Dronina Yu.E., Tartakovsky I.S., Sadretdinova O.V., Karpova T.I., Novokshonova I.V., Gruzdeva O.A., Karazhas N.V., Rybalkina T.N. [Serologic characteristic of *Legionella pneumophila* strains isolated from potentially dangerous water systems in russian federation in 2007–2011]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2012; 2:23–8.
- Tartakovsky I.S., Gruzdeva O.A., Galstyan G.M., Karpova T.I. [Prophylaxis, Diagnostics, and Treatment of Legionellosis]. Moscow; 2013. 344 p.
- Dilger T., Melzl H., Gessner A. *Legionella* contamination in warm water systems: a species-level survey. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2018; 221(2):199–210. DOI: 10.1016/j.ijheh.2017.10.011.
- Dilger T., Melzl H., Gessner A.J. Rapid and reliable identification of waterborne *Legionella* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbiol. Methods.* 2016; 127:154–9. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.05.028.
- Zhan X.-Y., Zhu Q.-Y. Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolates from environmental water samples and clinical samples using a five-gene sequence typing and standard Sequence-Based Typing. *PLoS ONE.* 2018; 13(2):e0190986. DOI: 10.1371/journal.pone.0190986.
- Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Kulichenko A.N., Portenko

S.A., Gus'kov A.S., Pochtareva E.S., Savel'eva I.V., Volynkina A.S., Savel'ev V.N., Mikhailova M.E., Kuznetsova I.V., Bobenko O.A., Efremenko D.V., Kazakova E.S., Krasovskaya T.Yu., Kuklev V.E., Kas'yan I.A., Bil'ko E.A., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P., Platonov M.E., Teimurazov M.G., Polosenko O.V., Eldinova V.E., Boiko E.A., Malay V.I., Klindukhov V.P., Grechanaya T.V., Nikolaevich P.N., Biryukov V.A., Bozhko I.I., Shcherbina L.I., Pogudina O.A. [Management of the investigation and detection of legionellosis agent in the environmental samples during the preparation and holding of the XXII Winter Olympics and XI Paralympics in Sochi]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; 2:50–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-50-53.

11. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Kulichenko A.N., Ryazanova A.G., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Dikova S.P., Volynkina A.S., Lisitskaya Ya.V., Kazakova E.S., Portenko S.A., Krasovskaya T.Yu., Sharova I.N., Kuklev V.E., Safronov V.A., Razdorsky A.S., Karnaukhov I.G. [Results of work of the Rospotrebnadzor SAET on the provision of sanitary epidemiological welfare of the population during the summer health-promotion campaign, 2014 in the Crimean Federal District]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; 4:45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-45-48.

12. Gaia V., Fry N.K., Afshar B., Luck P.C., Meugnier H., Etienne J., Peduzzi R., Harrison T.G. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 2005;

43(5):2047–52. DOI: 10.1128/JCM.43.5.2047-2052.2005.

13. Lück C., Fry N.K., Helbig J.H., Jarraud S., Harrison T.G. Typing methods for *Legionella*. In: Buchrieser C., Hilbi H., editors. *Legionella. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. NJ, Totowa: Humana Press; 2013. Vol. 954. P. 119–48. DOI: 10.1007/978-1-62703-161-5\_6.

**Authors:**

Portenko S.A., Abdrashitova A.S., Shcherbakova N.E., Erokhin P.S., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., Shcherbakova S.A., Kutyrrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

**Об авторах:**

Портенко С.А., Абдрашитова А.С., Щербакова Н.Е., Ерохин П.С., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарпова Н.А., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 27.11.19.

Принята к публ. 03.12.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-92-96

УДК 616.98:579.834.114(571.1)

С.А. Рудакова<sup>1</sup>, О.Е. Теслова<sup>1</sup>, Н.Е. Канешова<sup>1</sup>, С.В. Штрек<sup>1,2</sup>, В.В. Якименко<sup>1</sup>, Н.А. Пенъевская<sup>1,2</sup>**ГЕНОВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БОРРЕЛИЙ В ИКСОДОВЫХ КЛЕЩАХ НА ТЕРРИТОРИИ ЮГА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ**<sup>1</sup>ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций», Омск, Российская Федерация; <sup>2</sup>ГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Омск, Российская Федерация

**Цель** – определение геновидового состава боррелий в иксодовых клещах различных видов в природных очагах иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ) юга Западной Сибири. **Материалы и методы.** Исследовано бактериологическим (посев на питательную среду BSK-H, SIGMA, США) и молекулярно-генетическим (ПЦР в режиме реального времени) методами 1148 экз. иксодовых клещей, собранных с растительности, и 2183 экз. клещей, снятых с людей. Генотипирование боррелий проводили путем секвенирования. **Результаты и обсуждение.** Инфицированность клещей боррелиями варьировала от 22,4 % в Республике Алтай до 56,9 % в Новосибирской области. Существенных различий в уровнях инфицированности боррелиями клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskiy* не установлено (средний уровень зараженности 40,0 и 38,8 % соответственно). Изучение геновидового состава боррелий, циркулирующих в природных очагах Западной Сибири, показало наличие как минимум четырех геновидов патогенных боррелий (*B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis* и *B. miyamotoi*). В базу данных GenBank депонировано 30 нуклеотидных последовательностей межгенного спейсера rrf (5S)-rrl (23S). Частота выявления геновидов *B. garinii* и *B. afzelii* у клещей различных видов (*I. persulcatus* и *I. pavlovskiy*) не имеет значимых отличий. Отмечена более частая встречаемость *B. garinii* по сравнению с *B. afzelii*. Уровни инфицированности клещей *I. persulcatus* боррелиями *B. miyamotoi* существенно ниже (в 3,5 раза), чем геновидами *B. garinii* и *B. afzelii*. В клещах *D. reticulatus* выявлена ДНК *B. spielmanii* и *B. miyamotoi*. Необходимо продолжение исследований по оценке роли луговых клещей *D. reticulatus* в циркуляции боррелий различных геновидов в природных очагах на территории Российской Федерации.

**Ключевые слова:** иксодовые клещи, боррелии, клещевые боррелиозы.

Корреспондирующий автор: Пенъевская Наталья Александровна, e-mail: nap20052005@yandex.ru.

Для цитирования: Рудакова С.А., Теслова О.Е., Канешова Н.Е., Штрек С.В., Якименко В.В., Пенъевская Н.А. Геновидовое разнообразие боррелий в иксодовых клещах на территории юга Западной Сибири. Проблемы особо опасных инфекций. 2019; 4:92–96. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-92-96

S.A. Rudakova<sup>1</sup>, O.E. Teslova<sup>1</sup>, N.E. Kaneshova<sup>1</sup>, S.V. Shtrek<sup>1,2</sup>, V.V. Yakimenko<sup>1</sup>, N.A. Penyevskaya<sup>1,2</sup>**Genospecies Diversity of Borrelia in Ixodes Ticks of the West Siberia**<sup>1</sup>Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation; <sup>2</sup>Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

**Abstract. Objective:** to determine genospecies composition of Borrelia in the ixodid ticks of various species in natural foci of Ixodes tick-borne borreliosis (ITB) in the South of Western Siberia. **Materials and methods.** A total of 1148 examples of ticks collected from vegetation and 2183 examples of ticks withdrawn from persons seeking medical help have been tested by bacteriological (sowing in BSK-H medium, SIGMA, USA) and Real Time PCR methods. Genotyping of Borrelia was performed by sequencing. **Results and conclusions.** Infection of Ixodes ticks with borrelia ranged from 22.4 % in the Altay Republic to 56.9 % in the Novosibirsk Region. Reliable differences in borrelia infection rates of ticks *I. persulcatus* and *I. pavlovskiy* have not been established (average levels of infection 40 % and 38.8 %, respectively). The study of isolates of borrelia sp. circulating in natural foci of the West Siberia showed the presence of at least four genospecies of pathogenic borrelia (*B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. miyamotoi*). 30 nucleotide sequences of the rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer were submitted to GenBank database. The detection rate of genospecies *B. garinii* and *B. afzelii* of different types of ticks (*I. persulcatus* and *I. pavlovskiy*) has no significant difference. More frequent occurrence of *B. garinii* in comparison with that of *B. afzelii* was determined. The level of *I. persulcatus* ticks infection with *B. miyamotoi* was significantly lower than that with genospecies *B. garinii* and *B. afzelii*. DNA of *B. spielmanii* and *B. miyamotoi* was detected in ticks *D. reticulatus*. Further evaluation of the role of ticks *D. reticulatus* in the distribution of borrelia in ticks in natural foci of the Russian Federation is necessary.

**Key words:** Ixodes tick-borne, borrelia sp., tick-borne borreliosis.

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

Corresponding author: Natalia A. Penyevskaya, e-mail: nap20052005@yandex.ru.

Citation: Rudakova S.A., Teslova O.E., Kaneshova N.E., Shtrek S.V., Yakimenko V.V., Penyevskaya N.A. Genospecies Diversity of Borrelia in Ixodes Ticks of the West Siberia. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2019; 4:92–96. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-92-96  
Received 04.12.19. Accepted 09.12.19.

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – это передаваемая клещами бактериальная инфекция, вызываемая боррелиями, входящими в комплекс

*Borrelia burgdorferi sensu lato*. Комплекс включает в себя не менее 19 генотипов по всему миру [1–4]. Патогенность пяти из них убедительно доказана –

это *B. burgdorferi sensu stricto* в Северной Америке и Европе, а также *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* и *B. spielmanii* в Евразии [5, 6]. Для трех видов – *B. lusitaniae*, *B. bissettii* и *B. valaisiana* – статус патогенности окончательно не определен, поскольку они редко обнаруживаются у пациентов [7–9].

В Российской Федерации ИКБ этиологически связаны преимущественно с *B. afzelii* и *B. garinii*, которые имеют общих резервуарных хозяев и переносчиков. Ареал возбудителей определяется областью распространения их основных переносчиков – клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus*. В Сибири и на Дальнем Востоке в передаче могут принимать участие клещи *I. pavlovskiy* [10, 11]. Сравнительно недавно доказано, что этиология части безэритемных форм ИКБ может быть связана с *Borrelia miyamotoi*, которые, в отличие от боррелий комплекса *B. burgdorferi sensu lato*, хотя и переносятся теми же иксодовыми клещами, генетически ближе к боррелиям клещевых возвратных лихорадок [12, 13].

Одной из задач Референс-центра по мониторингу за боррелиозами, функционирующего на базе Омского НИИ природно-очаговых инфекций, является углубленное изучение выделенных культур представителей порядка *Spirochaetales* с использованием современных методов анализа и характеристики возбудителей ИКБ на территории Российской Федерации. Регионы юга Западной Сибири характеризуются наличием напряженных сочетанных очагов природно-очаговых инфекций, передающихся иксодовыми клещами [14, 15], среди которых первое место по распространенности и общей величине социально-экономических потерь занимают иксодовые клещевые боррелиозы. Вместе с тем клинические проявления и исходы ИКБ достаточно разнообразны. Одной из причин данного явления может быть неоднородность этиологической структуры возбудителей ИКБ. Лесостепные ландшафты юга Западной Сибири характеризуются наличием двух фоновых видов иксодовых клещей: *Ixodes persulcatus* и *Dermacentor reticulatus*. Доказана роль клещей *I. persulcatus* как основного переносчика боррелий в Западно-Сибирском регионе [16], однако роль луговых клещей *D. reticulatus* в распространении боррелий до настоящего времени до конца не изучена [17–19].

**Цель работы** – определение геновидового состава боррелий в иксодовых клещах различных видов в природных очагах ИКБ юга Западной Сибири.

### Материалы и методы

Бактериологическим (посев на питательную среду) и молекулярно-генетическим (ПЦР в режиме реального времени – ПЦР-РТ) методами исследовано 1148 экз. иксодовых клещей, собранных с растительности: 516 экз. *I. persulcatus* (Омский р-н, Омская обл.); 140 экз. *I. persulcatus*, 185 экз. *I. pavlovskiy* (Академгородок, Новосибирская обл.);

86 экз. *I. persulcatus*, 30 экз. *I. pavlovskiy* (Республика Алтай); 114 экз. *I. persulcatus*, 77 экз. *I. pavlovskiy* (Кемеровская область). Проведено также исследование клещей, снятых с людей, обратившихся за медицинской помощью: 687 экз. *I. persulcatus* и 1496 экз. *D. reticulatus*. Для определения видовой принадлежности клещей из природных станций использовали фенотипические признаки и молекулярно-биологический метод. Определение видовой принадлежности клещей в суспензиях проводили методом ПЦР-РТ. С этой целью использовали методику на основе метода мультипрайм-ПЦР в реальном времени, позволяющую проводить дифференциальное генотипирование клещей видов *I. ricinus*, *I. persulcatus* и *I. pavlovskiy*. В качестве мишени использовали фрагмент гена цитохромоксидазы (COI) [11].

Выделение штаммов боррелий проводили путем посева суспензий клещей на питательную среду BSK-H (SIGMA, США). Положительные в ПЦР пробы суспензий клещей засеивали на питательную среду, термостатировали при 33 °С с просмотром через три недели в течение двух месяцев. Выделение нуклеиновых кислот проводили из индивидуальных экземпляров клещей, отмытых и гомогенизированных на аппарате TissueLyser LT («Qiagen», Германия), наборами «АмплиПрайм РИБО-преп» компании «ИнтерЛабСервис» (Россия) и набором реагентов «РеалБест экстракция 100» ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Исследование суспензии клещей методом ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе «CFX96» (Bio-Rad, США). Для выявления ДНК боррелий использовали наборы: «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l./PHK ВКЭ» и «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*» ЗАО «Вектор-Бест».

Генотипирование осуществляли путем секвенирования межгенного спейсера *grf* (5S)-*rrl* (23S) [20, 21] с использованием генетического анализатора Applied Biosystems 3500/3500xL (США), полимер POP-6, длина капилляра 50 см. Секвенсовая реакция проводилась с использованием реагентов BigDye Terminator v. 1.1. Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Выравнивание биологической последовательности осуществляли в редакторе BioEdit. Сравнение установленных нуклеотидных последовательностей по степени гомологии с данными, представленными в базе данных GenBank, проводили с помощью поисковой системы BLAST.

### Результаты и обсуждение

Уровни инфицированности иксодовых клещей боррелиями *B. burgdorferi* s. l. на различных территориях юга Западной Сибири (по данным ПЦР-РТ) составили 38,3 % для *I. persulcatus* в Омской области; 53,5 % для *I. persulcatus* и 56,9 % для *I. pavlovskiy* в Новосибирской области; 22,4 % – *I. persulcatus* и 24,1 % – *I. pavlovskiy* в Республике Алтай; 44,1 % – *I. persulcatus* и 35,5 % – *I. pavlovskiy* в Кемеровской

области. ДНК *B. miyamotoi* выявлена в *I. persulcatus*, собранных в Омской области (10,0 % от всех собранных на этой территории клещей), в Новосибирской области (15,4 %), в Республике Алтай (17,1 %) и Кемеровской области (13,2 %) (таблица). На питательной среде BSK-H выделены 24 штамма боррелий, которые были изучены путем секвенирования, установлены нуклеотидные последовательности, определен геновид боррелий. В результате генотипирования штаммов боррелий геновид *B. garinii* определен в 20 изолятах, *B. afzelii* – в 3 изолятах и *B. bavariensis* – в 1 культуре боррелий. Результаты генотипирования боррелий в 8 пробах суспензий клещей показали наличие *B. garinii* в 1 пробе, *B. afzelii* – в 5, *B. bavariensis* – в 1, *B. miyamotoi* – 1 пробе. Установлен геновидовой состав боррелий в клещах различных видов. Так, для клещей *I. persulcatus* в 13 пробах установлены *B. garinii*, в 2 – *B. afzelii*, в 1 пробе – *B. bavariensis*, в клещах *I. pavlovskiy* в 8 пробах – *B. garinii*, в 1 пробе – *B. afzelii*.

Соотношение различных геновидов боррелий в изолятах, полученных на питательной среде и в суспензии клеща, имеют существенные отличия. Так, в изолятах, полученных на питательной среде, существенно преобладает геновид *B. garinii*, а в пробах из клещей преобладает геновид *B. afzelii*. Это может быть связано с преимущественным ростом на питательной среде боррелий *B. garinii* и подавлением роста *B. afzelii*. В связи с этим «золотой» стандарт микробиологии – изучение штаммов боррелий, по-

лученных на питательной среде, не всегда может отражать действительную картину геновидового разнообразия боррелий в природных очагах ИКБ. В свою очередь, генотипирование боррелий, обнаруженных в суспензии клещей, не всегда возможно путем секвенирования из-за недостаточного количества микроорганизмов в пробе. Возникает необходимость в разработке праймеров, позволяющих проводить генотипирование боррелий непосредственно в пробе из клещей методом ПЦР-РТ. Некоторыми учеными предприняты попытки разработки данного метода генотипирования [22], однако он не нашел пока широкого применения.

Полученные в результате секвенирования межгенного спейсера 5S-23S 30 нуклеотидные последовательности (НП) депонированы в международной базе данных GenBank: 13 НП – *B. afzelii* (МК118769.1, МК118768.1, МК118767.1, МК118766.1, МК118763.1, МК118757.1, МК118756.1, МК118755.1, МК118754.1, МК118753.1, МК118752.1, МК118751.1, МК118750.1); 12 НП – *B. garinii* (МК118765.1, МК118764.1, МК118762.1, МК118761.1, МК118760.1, МН782659.1, МН782658.1, МН782657.1, МН777466.1, МН777465.1, МН401039.1, МН388433.1); 2 НП – *B. bavariensis* (МК118758, МК118759), 1 НП – *B. miyamotoi* (МН719905), 2 НП – *B. spielmanii* (МН685134, МН695027).

Среднемноголетняя инфицированность боррелиями клещей *D. reticulatus*, по данным ПЦР, составляет 1,14 %. В 2019 г. в клещах *D. reticulatus*, сня-

Геновидовой состав боррелий в иксодовых клещах на территории юга Западной Сибири  
Genospecies diversity of Borrelia in Ixodes ticks of the West Siberia

Виды иксодовых клещей / Genus of Ixodes ticks	Субъекты РФ / Administrative regions of the Russian Federation	Исследовано клещей, экз. / ticks was tested, samples	Зараженность клещей <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (ПЦР-РТ), % / Infection of ticks by <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (RT-PCR), %	Зараженность клещей <i>B. miyamotoi</i> (ПЦР-РТ), % / Infection of ticks by <i>B. miyamotoi</i> (RT-PCR), %	Идентификация геновидов боррелий методом секвенирования / Identification of <i>Borrelia</i> genospecies by sequencing method				
					<i>B. garinii</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. bavariensis</i>	<i>B. spielmanii</i>	<i>B. miyamotoi</i>
<i>I. persulcatus</i>	Омская область / Omsk region	516	38,3	10,0	+	+	-	-	+
	Новосибирская область / Novosibirsk region	140	53,5	15,4	+	+	-	-	+
	Республика Алтай / Altai Republic	86	22,4	17,1	+	+	+	-	+
	Кемеровская область / Kemerovo region	114	44,1	13,2	+	+	-	-	+
<i>I. pavlovskiy</i>	Новосибирская область / Novosibirsk region	185	56,9	0	+	+	-	-	-
	Республика Алтай / Altai Republic	30	24,1	0	+	+	-	-	-
	Кемеровская область / Kemerovo region	77	35,5	0	+	+	-	-	-
<i>D. reticulatus</i>	Омская область / Omsk region	1496	1,53	0,13	-	-	-	+	+

Примечание: «+» – выявление геновида боррелий, обозначенного в заголовке столбца, «-» – геновид не определен

Note: “+” – detection of *Borrelia* genospecies, indicated in the column header, “-” – was not determined

тых с людей, боррелии выявлены в 1,53 % случаев. Методом ПЦР в реальном времени установлено наличие ДНК *B. miyamotoi* в клещах этого вида в 0,13 % случаев. Ранее нами при исследовании *D. reticulatus* методом ПЦР с применением рестрикционного анализа было показано наличие боррелий, близких к *B. afzelii*, в 4,8 % случаев [14, 17]. Нуклеотидные последовательности ДНК боррелий, полученные при исследовании двух клещей *D. reticulatus* в 2004 г., депонированы в GenBank как *Borrelia* sp. (AY540051, AY540052). В 2019 г. при сравнении этих нуклеотидных последовательностей с последовательностями, представленными в базе GenBank, с помощью поисковой системы BLAST получены данные о более чем 95 % гомологии с *Borrelia spielmanii* (AF497994.1, JX910054.1, JX448322.1).

Таким образом, на территории юга Западной Сибири инфицированность клещей боррелиями варьирует от 22,4 % в Республике Алтай до 56,9 % в Новосибирской области. Существенных различий в показателях зараженности боррелиями клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskiy* не установлено (40,0 % и 38,8 % соответственно). Изучение геновидового состава боррелий в иксодовых клещах в природных очагах юга Западной Сибири показало наличие как минимум четырех геновидов патогенных боррелий (*B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis* и *B. miyamotoi*). Частота выявления *B. garinii* и *B. afzelii* у клещей различных видов (*I. persulcatus* и *I. pavlovskiy*) не имеет значимых отличий. Отмечается более частая встречаемость *B. garinii* по сравнению с *B. afzelii*. Уровни инфицированности клещей *I. persulcatus* боррелиями *B. miyamotoi* существенно ниже (в 3,5 раза), чем геновидами *B. garinii* и *B. afzelii*.

Изучение геновидового разнообразия боррелий в переносчиках и выделенных штаммах важно для выявления экологических особенностей различных видов боррелий и степени эпидемической опасности природных очагов иксодовых клещевых боррелиозов. Необходимо продолжение исследований по оценке роли луговых клещей *D. reticulatus* в циркуляции боррелий различных геновидов в природных очагах на территории Российской Федерации.

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

### Список литературы

- List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bacterio.net/borrelia.html> (дата обращения 04.03.19).
- Chu C.Y., Liu W., Jiang B.G., Wang D.M., Jiang W.J., Zhao Q.M., Zhang P.H., Wang Z.X., Tang G.P., Yang H., Cao W.C. Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from rodents and ticks in southwestern China. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(9):3130–3. DOI: 10.1128/JCM.01195-08.
- Margos G., Vollmer S.A., Ogden N.H., Fish D. 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.
- Margos G., Wilske B., Sing A., Hizo-Teufel C., Cao W.C., Chu C., Scholz H., Straubinger R.K., Fingerle V. *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013; 63(Pt 11):4284–8. DOI: 10.1099/

ijs.0.052001-0.

- Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.R., Baranton G. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56(Pt 4):873–81. DOI: 10.1099/ijs.0.64050-0.
- Wang G., Liveris D., Mukherjee P., Jungnick S., Margos G., Schwartz I. Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2014; 34:12C.5.1–12C.5.31. DOI: 10.1002/9780471729259.mc12c05s34.
- Sprong H., Azagi T., Hoornstra D., Nijhof A.M., Knorr S., Baarsma M.E., Hovius J.W. Control of Lyme borreliosis and other Ixodes ricinus-borne diseases. *Parasit. Vectors.* 2018; 11(1):145. DOI: 10.1186/s13071-018-2744-5.
- 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.
- Wang G. *Borrelia burgdorferi* and Other *Borrelia* Species. In: Yi-Wei Tang, Max Sussman, Dongyou Liu, Ian Poxtan, Joseph Schwartzman, editors. *Molecular Medical Microbiology*, 2nd edition. Boston: Academic Press; 2015. Vol. 3. P. 1867–909. DOI: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00104-9.
- Korenberg E.I., Nefedova V.V., Romanenko V.N., Gorelova N.B. The tick *Ixodes Pavlovskiy* as host of spirochetes pathogenic for humans and its possible role in the epizootology and epidemiology of borrelioses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10(5):453–8. DOI: 10.1089/vbz.2009.0033.
- Рудаков Н.В., Рудакова С.А., Ефимова А.Р., Дроздова О.М., Любенко А.Ф., Петрова Ю.А., Якименко В.В., Дедков В.Г. Современные подходы к изучению клещевых трансмиссивных инфекций в Кузбассе на основе молекулярных методов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(1):26–8. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-1-26-28.
- Платонов А.Е., Koetsveld J., Колясникова Н.М., Сарксян Д.С., Топоркова М.Г., Шипулин Г.А., Hovius J.W. Микробиологическое подтверждение этиологии иксодового клещевого боррелиоза в безрзрительной форме – инфекции, вызываемой *Borrelia miyamotoi*. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(1):29–35. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-1-29-35.
- Cosson J.F., Michelet L., Chotte J., Naour E. Le, Cote M., Devillers E., Poule M.L., Huet D., Galan M., Geller J., Moutailler S., Vayssier-Taussat M. Genetic characterization of the human relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in vectors and animal reservoirs of Lyme disease spirochetes in France. *Parasit. Vectors.* 2014; 7:233. DOI: 10.1186/1756-3305-7-233.
- Rar V., Fomenko N., Dobrotvorskyy A., Livanova N., Rudakova S., Fedorov E., Astanin V., Morozova O. Tick-borne Pathogen Detection, Western Siberia, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(11):1708–15. DOI: 10.3201/eid1111.041195.
- Rar V., Livanova N., Tkachev S., Kaverina G., Tikunov A., Sabitova Yu., Igolkina Ya., Panov V., Livanov S., Fomenko N., Babkin I., Tikunova N. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskiy* ticks in Western Siberia, Russia. *Parasit. Vectors.* 2017; 10(1):258. DOI: 10.1186/s13071-017-2186-5.
- Коренберг Э.И. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами в лесной зоне, и стратегия их профилактики: изменение приоритетов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013; 5:7–17.
- Рудакова С.А., Матушенко А.А., Фоменко Н.В., Тупикин А.Е. Генотипическая характеристика боррелий, циркулирующих в природных очагах Западной Сибири. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2005; 2(40):227–30.
- Kohn M., Krücken J., McKay-Demeler J., Pachnicke S., Krieger K., von Samson-Himmelstjerna G. *Dermacentor reticulatus* in Berlin/Brandenburg (Germany): Activity patterns and associated pathogens. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019; (1):191–206. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.10.003.
- Zajac V., Wójcik-Fatla A., Sawczyn A., Cisak E., Sroka J., Kloc A., Zajac Z., Buczek A., Dutkiewicz J., Bartosik K. Prevalence of infections and co-infections with 6 pathogens in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2017; 24(1):26–32. DOI: 10.5604/12321966.1233893.
- Postic D., Assous M.V., Grimont P.A., Baranton G. Diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994; 44(4):743–52. DOI: 10.1099/00207713-44-4-743.
- Coipan E.C., Fonville M., Tijssse-Klasen E., van der Giessen J.W., Takken W., Sprong H., Takumi K. Geodemographic analysis of *Borrelia burgdorferi sensu lato* using the 5S-23S rDNA spacer region. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 17:216–22. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.04.009.
- Mukhacheva T.A., Kovalev S.Y. *Borrelia spirochetes* in Russia: genospecies differentiation by real-time PCR. *Ticks Tick-borne Dis.* 2014. 5(6):722–26. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.05.016.

## References

- List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. [Internet]. (Cited 04 Mar 2019). Available from: <http://www.bacterio.net/borrelia.html>.
- Chu C.Y., Liu W., Jiang B.G., Wang D.M., Jiang W.J., Zhao Q.M., Zhang P.H., Wang Z.X., Tang G.P., Yang H., Cao W.C. Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(9):3130–3. DOI: 10.1128/JCM.01195-08.
- Margos G., Vollmer S.A., Ogden N.H., Fish D. 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.
- Margos G., Wilske B., Sing A., Hizo-Teufel C., Cao W.C., Chu C., Scholz H., Straubinger R.K., Fingerle V. *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013; 63(Pt 11):4284–8. DOI: 10.1099/ijs.0.052001-0.
- Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.R., Baranton G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56(Pt 4):873–81. DOI: 10.1099/ijs.0.64050-0.
- Wang G., Liveris D., Mukherjee P., Jungnick S., Margos G., Schwartz I. Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2014; 34:12C.5.1–12C.5.31. DOI: 10.1002/9780471729259.mc12c05s34.
- Sprong H., Azagi T., Hoornstra D., Nijhof A.M., Knorr S., Baarsma M.E., Hovius J.W. Control of Lyme borreliosis and other Ixodes ricinus-borne diseases. *Parasit. Vectors.* 2018; 11(1):145. DOI: 10.1186/s13071-018-2744-5.
- 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.
- Wang G. *Borrelia burgdorferi* and Other *Borrelia* Species. In: Yi-Wei Tang, Max Sussman, Dongyou Liu, Ian Poxton, Joseph Schwartzman, editors. *Molecular Medical Microbiology*. 2nd edition. Boston: Academic Press; 2015. Vol. 3. P. 1867–909. DOI: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00104-9.
- Korenberg E.I., Nefedova V.V., Romanenko V.N., Gorelova N.B. The tick *Ixodes Pavlovskyi* as host of spirochetes pathogenic for humans and its possible role in the epizootology and epidemiology of borrelioses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10(5):453–8. DOI: 10.1089/vbz.2009.0033.
- Platonov A.E., Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Sarksyian D.S., Toporkova M.G., Shipulin G.A., Hovius J.W. Microbiological Evidence of Etiology of «Ixodes Tick-Borne Borreliosis without Erythema Migrans» – Infection Caused by *Borrelia miyamotoi* *Epidemiologia i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2017; 16(1):29–35. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-1-29-35.
- Cosson J.F., Michelet L., Chotte J., Naour E. Le, Cote M., Devillers E., Pouille M.L., Huet D., Galan M., Geller J., Moutailler S., Vayssier-Taussat M. Genetic characterization of the human relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in vectors and animal reservoirs of Lyme disease spirochetes in France. *Parasit. Vectors.* 2014; 7:233. DOI: 10.1186/1756-3305-7-233.
- Rar V., Fomenko N., Dobrotvorskyy A., Livanova N., Rudakova S., Fedorov E., Astanin V., Morozova O. Tick-borne Pathogen Detection, Western Siberia, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(11):1708–15. DOI: 10.3201/eid1111.041195.
- Rar V., Livanova N., Tkachev S., Kaverina G., Tikunov A., Sabitova Yu., Igolkina Ya., Panov V., Livanov S., Fomenko N., Babkin I., Tikunova N. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia. *Parasit. Vectors.* 2017; 10(1):258. DOI: 10.1186/s13071-017-2186-5.
- Korenberg E.I. Infections transmitted by ticks in the forest area and the strategy of their prevention: change of priorities. *Epidemiologia i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2013; 72(5):7–17.
- Rudakova S.A., Matuschenko A.A., Fomenko N.V., Tupikin A.E. Genotypic characteristics of borrelia circulating in the natural foci of Western Siberia. [Bulletin of the East Siberian Research Center of the RAMS]. 2005; 2 (40):227–30.
- Kohn M., Krücken J., McKay-Demeler J., Pachnicke S., Krieger K., von Samson-Himmelstjerna G. *Dermacentor reticulatus* in Berlin/Brandenburg (Germany): Activity patterns and associated pathogens. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019; (1):191–206. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.10.003.
- Zajac V., Wójcik-Fatla A., Sawczyn A., Cisak E., Sroka J., Kloc A., Zajac Z., Buczek A., Dutkiewicz J., Bartosik K. Prevalence of infections and co-infections with 6 pathogens in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2017; 24(1):26–32. DOI: 10.5604/12321966.1233893.
- Postic D., Assous M.V., Grimont P.A., Baranton G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994; 44(4):743–52. DOI: 10.1099/00207713-44-4-743.
- Coipan E.C., Fonville M., Tijssse-Klasen E., van der Giessen J.W., Takken W., Sprong H., Takumi K. Geodemographic analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato using the 5S-23S rDNA spacer region. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 17:216–22. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.04.009.
- Mukhacheva T.A., Kovalev S.Y. *Borrelia spirochetes* in Russia: genospecies differentiation by real-time PCR. *Ticks Tick-borne Dis.* 2014. 5(6):722–26. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.05.016.

## Authors:

Rudakova S.A., Teslova O.E., Kaneshova N.E., Yakimenko V.V. Omsk Research Institute of Natural-Focal Infections, 7, Prospect Mira, Omsk, 644080, Russian Federation. E-mail: [mail@oniipi.org](mailto:mail@oniipi.org).

Shtrek S.V., Penyevskaya N.A. Omsk Research Institute of Natural-Focal Infections; 7, Prospect Mira, Omsk, 644080, Russian Federation; e-mail: [mail@oniipi.org](mailto:mail@oniipi.org). Omsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Omsk, Russian Federation.

## Об авторах:

Рудакова С.А., Теслова О.Е., Канешова Н.Е., Якименко В.В. Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций; Российская Федерация, 644080, Омск, Проспект Мира, 7. E-mail: [mail@oniipi.org](mailto:mail@oniipi.org).

Штрек С.В., Пеневская Н.А. Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций; Российская Федерация, 644080, Омск, Проспект Мира, 7; e-mail: [mail@oniipi.org](mailto:mail@oniipi.org). Омский государственный медицинский университет; Омск. Российская Федерация.

Поступила 04.12.19.

Принята к публ. 09.12.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-97-101

УДК 616.98:579.842.23

В.В. Сутягин<sup>1</sup>, Г.Г. Ковалёва<sup>2</sup>**БЕЛКИ ВАКЦИННОГО ШТАММА ЧУМНОГО МИКРОБА (*YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ) С ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ АЛЛЕРГЕНОВ**

<sup>1</sup>РГУ «Талдыкорганская противочумная станция», Талдыкорган, Республика Казахстан; <sup>2</sup>РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Алматы, Республика Казахстан

**Цель** исследования – поиск белков вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с потенциальными свойствами аллергенов. **Материалы и методы.** Проанализировано 3256 геномных белков штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, взятых из базы данных GenBank. Определение аллергенности белков проводилось с использованием информативных компьютерных программ. Программа Allpred, интегрированная в систему Protein Structure Discovery для предсказания белков, как аллергенов, использует не только первичную последовательность аминокислот, но и их пространственную структуру, а также физико-химические свойства аминокислот. Для всех найденных потенциальных аллергенов дополнительно определялась их внутриклеточная локализация с помощью программы CELLO v.2.5: subCELLular LocalizaTion predictor и сходство с известными аллергенами человека в программе AllergenOnline. **Результаты и обсуждение.** Компьютерный анализ 3256 белков позволил выявить 170 (5,22 %) потенциальных аллергенных белков вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Из них 53 (31,18 %) относятся к белкам с неизвестной функцией (hypothetical protein), а 16 (9,41 %) к мембранным белкам (membrane protein). Наибольший показатель отнесения белка к аллергену составил 0,824568569477881 и отмечен у протеина EXU71465.1 (autotransporter). Сходство с известными аллергенами выявлено у 12 (7,06 %) предсказанных аллергенных протеинов. Из них 4 (2,35 %) протеина имеют аналоги с аллергенами растений, 5 (2,94 %) – с аллергенами представителей царства животных, 3 (1,76 %) – с аллергенами дрожжей и плесневых грибов. Наиболее перспективными при создании новых гипоаллергенных вакцин и препаратов для диагностики напряженности иммунитета у вакцинированных лиц определены белки-аллергены, относящиеся к группе экстрацеллюлярных, и белки наружной мембраны. Таких у вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ обнаружено 38 или 22,35 %.

**Ключевые слова:** аллергия, вакцинация, чума, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ.

Корреспондирующий автор: Сутягин Виталий Владимирович, e-mail: vit197803@mail.ru.

Для цитирования: Сутягин В.В., Ковалёва Г.Г. Белки вакцинного штамма чумного микроба (*Yersinia pestis* EV НИИЭГ) с потенциальными свойствами аллергенов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:97–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-97-101

V.V. Sutyagin<sup>1</sup>, G.G. Kovaleva<sup>2</sup>**Proteins of the plague microbe vaccine strain (*Yersinia pestis* EV NIIEG) with potential allergen properties**

<sup>1</sup>“Taldykorgan Plague Control Station”, Taldykorgan, Republic of Kazakhstan; <sup>2</sup>“National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections named after M. Aykimbaev”, Almaty, Republic of Kazakhstan

**Abstract. Objective** of the study was the search for proteins of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIIEG with potential properties of allergens. **Materials and methods.** 3256 genomic proteins of *Yersinia pestis* EV NIIEG strain taken from the GenBank database were analyzed. Protein allergenicity was determined using computer information software. The Allpred program, integrated into the Protein Structure Discovery system, for predicting proteins as allergens, uses not only the primary sequence of amino acids, but also their spatial structure, as well as the physicochemical properties of amino acids. For all potential allergens found, their intracellular localization was additionally determined using the CELLO v.2.5 program: subCELLular LocalizaTion predictor and similarity to known human allergens in the AllergenOnline program. **Results and discussion.** Computer analysis of 3256 proteins revealed 170 (5.22 %) potential allergenic proteins of the vaccine strain *Y. pestis* EV NIIEG. Of these, 53 (31.18 %) relate to proteins with an unknown function (hypothetical protein), and 16 (9.41 %) relate to membrane proteins (membrane protein). The highest indicator of protein attribution to allergen was 0.824568569477881, and was observed in protein EXU71465.1 (autotransporter). Similarities to known allergens were found in 12 (7.06 %) of the predicted allergenic proteins. Of these, 4 (2.35 %) proteins have analogues with plant allergens, 5 (2.94 %) – with allergens from the animal kingdom, and 3 (1.76 %) – with yeast and mold allergens. The most promising when creating new hypoallergenic vaccines and drugs for diagnosing intensity of immunity in vaccinated individuals the allergen proteins belonging to the group of extracellular ones and outer membrane proteins have been identified. In *Yersinia pestis* EV NIIEG vaccine strain 38 of these or 22.35 % have been detected.

**Key words:** allergy, vaccination, plague, *Yersinia pestis* EV NIIEG.

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

Corresponding author: Vitaliy V. Sutyagin, e-mail: vit197803@mail.ru.

Citation: Sutyagin V.V., Kovaleva G.G. Proteins of the plague microbe vaccine strain (*Yersinia pestis* EV NIIEG) with potential allergen properties. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:97–101. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-97-101

Received 05.11.19. Revised 15.11.19. Accepted 28.11.19.

Sutyagin V.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2152-1609>

На сегодняшний день вакцинация населения и профессионального контингента является основой профилактики чумы в странах СНГ. Так, в Республике Казахстан ежегодно вакцинируется порядка 100 тыс. человек. Штамм *Yersinia pestis* EV уже более 90 лет используется в качестве чумной живой вакцины для людей: он эффективно защищает как от бубонной, так и от легочной форм инфекции [1].

Однако при вакцинации возможно возникновение как общих, так и местных поствакцинальных реакций. Одной из причин развития поствакцинальных осложнений может быть аллергия. У многократно вакцинированных против чумы людей отмечено высокое содержание в крови IgE [2], который ответственен за формирование аллергических реакций. Выявлена прямая зависимость частоты проявления аллергических заболеваний от кратности вакцинации сотрудников противочумных учреждений [3]. Эти факты диктуют необходимость совершенствования существующей вакцины и разработки новых эффективных и безопасных вакцин.

Аллергическое воспаление тесно связано с функциональной активацией клеток врожденного иммунитета; альтернативой кожным пробам со специфическими аллергенами часто служат биологически безопасные методы оценки антибактериального иммунитета в условиях *in vitro*, основанные на выявлении особенностей морфологии активированных и поврежденных нейтрофилов, а также на количественном измерении степени дегенеративных изменений, развивающихся под влиянием специфического аллергена в ядерном хроматине и/или лизосомальных гранулах активированных нейтрофилов крови человека [4]. Для оценки иммуноаллергической перестройки организма при вакцинации и для определения наличия напряженности специфического иммунитета ранее использовали пестин – экстракт убитой культуры чумного микроба. Сейчас ведутся работы по изучению возможности использования пестина ПП (полипептидно-полисахаридного комплекса чумного микроба) в качестве тест-аллергена при постановке аллергопроб *in vitro* [5].

В связи с вышеизложенным возникает потребность в анализе аллергенных свойств белков для прогнозирования и предотвращения аллергических реакций при вакцинации и усовершенствования методов диагностики напряженности иммунитета. Однако к настоящему времени в литературе отсутствует информация о конкретных белках *Y. pestis*, которые могут быть потенциальными аллергенами.

**Целью** настоящего исследования явился поиск белков вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с потенциальными свойствами аллергенов.

### Материалы и методы

Экспериментальный метод определения аллергенности отдельных белков является довольно трудоемким, поэтому к настоящему времени раз-

работаны различные компьютерные программы для оценки и прогнозирования аллергенных свойств изучаемых протеинов. Для этого нами использовалась компьютерная программа Allpred, интегрированная в систему Protein Structure Discovery [6]. Данная программа, в отличие от других подобных программ, при анализе белков использует не только первичную последовательность аминокислот, но и их пространственную структуру, а также физико-химические свойства аминокислот [7–9]. Для отнесения анализируемого белка к аллергенам в программе используется дифференциальная функция (DF), которая может принимать значения от 0 до 1. При показателе DF выше определенного порога протеин относится к аллергенам.

Всего нами проанализировано 3256 геномных белков штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, взятых из базы данных GenBank [10].

Белки, предсказанные программой Allpred как аллергенные, дополнительно исследовались в компьютерной программе AllergenOnline [11, 12], для поиска сходства с известными аллергенами. Для этого использовалась процедура сравнения последовательностей полной длины аминокислот в формате FASTA. Значение *E*-порога задавалось 0,01, что позволяет предположить эволюционную связь между двумя сравниваемыми белками [13]. При наличии нескольких схожих аллергенов нами выбирался аллерген с наиболее высокими оценками идентичности.

При предсказании внутриклеточной локализации потенциальных белковых аллергенов применялась компьютерная программа CELLO v.2.5: sub-CELLular Localization predictor [14, 15]. Для предсказания субклеточной локализации данная программа использует четыре типа данных: аминокислотный состав, дипептидный состав, разделенный аминокислотный состав и состав последовательности, основанный на физико-химических свойствах аминокислот.

### Результаты и обсуждение

Ранее с применением методов предсказания уровня экспрессии генов микроорганизмов на основе анализа последовательностей ДНК установлена статистически значимая зависимость между уровнем экспрессии и предсказанной аллергенностью белков [7], а повышенная аллергенность микроорганизмов коррелировала с их патогенностью [9].

Секвенирование генома *Y. pestis* EV НИИЭГ [16] позволило использовать программу Allpred для предсказания аллергенности белков вакцинного штамма. Выполненный анализ 3256 белков вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ выявил среди них 170 (5,22 %) белков со свойствами потенциальных аллергенов.

Аллергены – это антигены, стимулирующие гиперчувствительность, опосредованную иммунологическими механизмами [17]. В практике целый ряд аллергенов бактерий (туберкулин, бруцеллин,

**Характеристика белков вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с потенциальными свойствами аллергенов**  
**Characterization of the proteins of the vaccine strain *Y. pestis* EV NIEEG with potential properties of allergens**

ID белка / Protein ID	Наименование белка / Name of protein	Величина DF / DF degree	Предсказанная локализация белка / Predicted protein localization	Известный аллерген [источник аллергена] / Known allergen [source of allergen]
EXU73183.1	Membrane protein	0.334211435515437	Наружная мембрана, экстрацеллюлярный / Outer membrane, extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU72936.1	Flagellar hook protein flge	0.349991537138249	Экстрацеллюлярный / Extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU72860.1	Adhesin	0.380366856705521	Экстрацеллюлярный, цитоплазма, периплазма / Extracellular, cytoplasm, periplasm	Не обнаружен / Not found
EXU72882.1	Hypothetical protein	0.322354878860553	Цитоплазма, экстрацеллюлярный / Cytoplasm, extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU72883.1	Terminase small subunit	0.445785059593053	Цитоплазма, периплазма, экстрацеллюлярный / Cytoplasm, periplasm, extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU72857.1	Autotransporter	0.333301003834688	Наружная мембрана, экстрацеллюлярный / Outer membrane, extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU72815.1	F17 fimbrial protein	0.354996152497964	Экстрацеллюлярный / Extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU72725.1	Hypothetical protein	0.47066790019916	Цитоплазма, экстрацеллюлярный / Cytoplasm, extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU72686.1	Proteinsa F	0.446157617098027	Наружная мембрана, цитоплазма, периплазма / Outer membrane, cytoplasm, periplasm	Не обнаружен / Not found
EXU72621.1	Hypothetical protein	0.398303967116568	Экстрацеллюлярный / Extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU72504.1	Frataxin-like protein	0.335305350977303	Экстрацеллюлярный, цитоплазма / Extracellular, cytoplasm	Не обнаружен / Not found
EXU72189.1	Lysogenization regulator	0.363904378936346	Наружная мембрана / Outer membrane	Не обнаружен / Not found
EXU72091.1	Hypothetical protein	0.32089005888469	Экстрацеллюлярный / Extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU72106.1	Hypothetical protein	0.346793996896739	Экстрацеллюлярный Extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU72109.1	Hypothetical protein	0.321364186522829	Цитоплазма, наружная мембрана / Cytoplasm, outer membrane	Arginine kinase [Amphioctopus fangsiao]
EXU71922.1	NAD (P) H:quinone oxidoreductase	0.489472723820182	Экстрацеллюлярный, цитоплазма, периплазма / Extracellular, cytoplasm, periplasm	Minor allergen Alt a 7 (Alt a VII) [Alternaria alternata]
EXU71924.1	Hypothetical protein	0.432556603494903	Цитоплазма, периплазма, экстрацеллюлярный / Cytoplasm, periplasm, extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU71938.1	Membrane protein	0.601785219976821	Периплазма, экстрацеллюлярный / Periplasm, extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU71640.1	Tellurium resistance protein terx	0.318990731569871	Экстрацеллюлярный, цитоплазма / Extracellular, cytoplasm	Не обнаружен / Not found
EXU71525.1	Membrane protein	0.355119890714812	Периплазма, наружная мембрана, экстрацеллюлярный / Periplasm, outer membrane, extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU71465.1	Autotransporter	0.824568569477881	Цитоплазма, периплазма, экстрацеллюлярный / Cytoplasm, periplasm, extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU71298.1	Autotransporter	0.323883465243816	Экстрацеллюлярный / Extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU71221.1	Ornithine carbamoyltransferase	0.326598917595075	Экстрацеллюлярный / Extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU71023.1	Fimbrial protein	0.399507107766683	Экстрацеллюлярный / Extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU70868.1	Hypothetical protein	0.385454700928765	Цитоплазма, периплазма, экстрацеллюлярный / Cytoplasm, periplasm, extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU70575.1	Hypothetical protein	0.337976396546586	Цитоплазма, наружная мембрана / Cytoplasm, outer membrane	Не обнаружен / Not found
EXU70557.1	Membrane protein	0.371649179100827	Периплазма, экстрацеллюлярный, цитоплазма / Periplasm, extracellular, cytoplasm	Не обнаружен / Not found
EXU70550.1	Membrane protein	0.322959769389867	Наружная мембрана, периплазма / Outer membrane, periplasm	Не обнаружен / Not found
EXU70516.1	Fimbrial protein	0.327312550133337	Наружная мембрана / Outer membrane	Не обнаружен / Not found
EXU70391.1	Hypothetical protein	0.373184001018088	Экстрацеллюлярный / Extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU70370.1	Hypothetical protein	0.434305925045286	Экстрацеллюлярный, наружная мембрана, цитоплазма / Extracellular, outer membrane, cytoplasm	Не обнаружен / Not found
EXU70277.1	Hypothetical protein	0.342655305608865	Экстрацеллюлярный, периплазма / Extracellular, periplasm	Не обнаружен / Not found
EXU70273.1	Autotransporter	0.346604863625	Экстрацеллюлярный / Extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU70269.1	Hypothetical protein	0.320125910160679	Периплазма, экстрацеллюлярный / Periplasm, extracellular	Allergen HMW glutenin x-type subunit Bx7 precursor [Triticum aestivum]
EXU70262.1	Hypothetical protein	0.329950412158077	Цитоплазма, периплазма, экстрацеллюлярный / Cytoplasm, periplasm, extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU70233.1	Aminotransferase V	0.361626216854573	Периплазма, цитоплазма, экстрацеллюлярный / Cytoplasm, periplasm, extracellular	Не обнаружен / Not found
EXU70224.1	Autotransporter	0.390657468475533	Экстрацеллюлярный, периплазма / Extracellular, periplasm	Не обнаружен / Not found
EXU70215.1	Transporter	0.389443024042644	Экстрацеллюлярный / Extracellular	Не обнаружен / Not found

лепромин) используют для специфической диагностики заболевания или оценки напряженности специфического иммунитета.

По нашим данным, среди 170 предполагаемых аллергенов вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ к белкам с неизвестной функцией (hypothetical protein) отнесены 53 (31,18 %), а к мембранным белкам (membrane protein) – 16 (9,41 %). Программный показатель отнесения белка к аллергенам (DF) был наибольшим у протеина EXU71465.1 (autotransporter) и составил 0,824568569477881.

При чуме гиперчувствительность замедленного типа – это обязательный компонент эффективности формирования специфического иммунного ответа. Определение иммунологической эффективности живой чумной вакцины – одна из ключевых задач оценки эффективности профилактических мероприятий в целом при отсутствии массовой заболеваемости людей чумой. Применение аллергенов в тестах *in vivo* и *in vitro* для оценки напряженности противочумного иммунитета значительно облегчило бы эту задачу, но отсутствие стандартизированных информативных аллергенов чумного микроба затрудняет продвижение исследований в этом направлении.

Второй момент – выявление у бактерий протеинов, сходных по своей биохимической структуре с компонентами клеток растительного и животного происхождения [18], и, хотя в литературе недостаточно аргументирована способность бактериальных антигенов стимулировать антибактериальный IgE-ответ, среди белков чумного микроба поиск схожести с известными аллергенами интересен. Нами установлено, что из 158 (92,94 %) предполагаемых аллергенных белков чумного микроба у 4 (2,35 %) обнаружена аналогия с аллергенами растений, у 5 (2,94 %) – с аллергенами представителей царства животных и у 3 (1,76 %) – с аллергенами дрожжей и плесневых грибов.

Белки являются основным агентом, вызывающим IgE-опосредованную аллергию [19]. Бактериальные аллергены способны вызывать антиген-специфическое освобождение гистамина из базофилов, что служит основанием для разработки тестов аллергодиагностики. Такие аллергены, как правило, относятся к экстрацеллюлярным белкам наружной мембраны. При анализе белков с аллергенным потенциалом у вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ (таблица) таковых обнаружено 38 (22,35 %).

По нашему мнению, информация о белках вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с потенциальными свойствами аллергенов, получаемая с помощью компьютерных программ, открывает новые возможности для специалистов, занимающихся как проблемой разработки новых безопасных противочумных вакцин, так и методов оценки их эффективности. При «редактировании» генов, кодирующих белки-аллергены для целей конструирования новых или совершенствования имеющейся живой вакцины, появляется возможность снижать риски разви-

тия нежелательных реакций. Также информация относительно выявленных белков с потенциальными свойствами аллергенов может быть применена при разработке современных информативных тестов для *in vitro* диагностики специфического противочумного иммунитета.

Таким образом, по результатам исследования определена группа экстрацеллюлярных белков и белков наружной мембраны у вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, наиболее перспективных для решения задач конструирования безопасных вакцин и эффективных средств аллергодиагностики.

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

### Список литературы

1. Дентовская С.В., Копылов П.Х., Иванов С.А., Агеев С.А., Анисимов А.П. Молекулярные основы вакцинопрофилактики чумы. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 3:3–12.
2. Ключева С.Н., Шмелькова Т.П., Щуковская Т.Н. Влияние олигодезоксинуклеотида CpG ODN 2006 на продукцию цитокинов клетками крови людей, вакцинированных против чумы. *Медицинская иммунология*. 2014; 16(6):531–8. DOI: 10.15789/1563-0625-2014-6-531-538.
3. Захаров А.В. О прививках против чумы сотрудников Уральской противочумной станции. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2013; 1(27):57–61.
4. Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П., Щуковская Т.Н. Влияние противочумной вакцинации на функциональную активность клеток врожденного иммунитета человека. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011; 1:77–80. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-77-80.
5. Гостишева С.Е., Абзаева Н.В., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Сирица Ю.В., Ракитина Е.Л., Афанасьев Е.Н., Костюченко М.В. Оптимизация метода получения пестицида ПШ и изучение его специфической активности *in vitro*. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8(1):85–90. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-85-90.
6. Protein structure discovery. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bionet.sccc.ru/psd/cgi-bin/programs/Allpred/allpred.cgi> (дата обращения 01.10.2019).
7. Брагин А.О., Деменков П.С., Иванисенко В.А. Предсказание аллергенности белков с использованием информации о конформационных пептидах. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2011; 15(3):462–8.
8. Брагин А.О., Деменков П.С., Тийс Е.С., Ховештадт Р., Иванисенко В.А., Колчанов Н.А. Компьютерный анализ взаимосвязи аллергенности микроорганизмов и среды их обитания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012; 16(4/1):784–90.
9. Брагин А.О., Соколов В.С., Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Брагина Е.Ю., Матушкин Ю.Г., Иванисенко В.А. Программа Allpred для предсказания аллергенности бактерий и архей. *Молекулярная биология*. 2018; 52(2):326–32. DOI: 10.7868/S0026898418020179.
10. NCBI. Protein. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=Yersinia+Pestis+EV> (дата обращения 01.10.2019).
11. Goodman R.E., Ebisawa M., Ferreira F., Sampson H.A., van Ree R., Vieths S., Baumert J.L., Bohle B., Lalithambika S., Wise J., Taylor S.L. AllergenOnline: A peer-reviewed, curated allergen database to assess novel food proteins for potential cross-reactivity. *Mol. Nutr. Food Res*. 2016; 60(5):1183–98. DOI: 10.1002/mnfr.201500769.
12. Allergenic Protein Sequence Searches. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.allergenonline.org/databasefasta.shtml> (дата обращения 01.10.2019).
13. Pearson W.R. Effective protein sequence comparison. *Methods Enzymol*. 1996; 266:227–58. DOI: 10.1016/S0076-6879(96)66017-0.
14. Yu C.S., Chen Y.C., Lu C.H., Hwang J.K. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2006; 64(3):643–51. DOI: 10.1002/prot.21018.
15. Molecular Bioinformatics Center. CELLO v.2.5: subCellular LOcalization predictor. [Электронный ресурс]. URL: <http://cello.life.nctu.edu.tw/> (дата обращения 01.10.2019).
16. Одиноков Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Анализ полногеномной последовательности штаммов *Yersinia pestis* на основе

ступенчатого 680-SNP алгоритма. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 3:49–54. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-3-49-54.

17. Johansson S.G.O. A revised nomenclature for allergy – condensed version of the EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy Clin. Immunol. Intern.* 2002; 14(6):279–87.

18. Федосеева В.Н. Аллергенные свойства бактерий. *Российский аллергологический журнал*. 2005; 3:3–11

19. Колхир П.В. Доказательная аллергология-иммунология. М.: Практическая медицина; 2010. 527 с.

## References

1. Dentovskaya S.V., Kopylov P.K., Ivanov S.A., Ageev S.A., Anisimov A.P. Molecular bases of vaccine-prevention of plague. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2013; 3:3–12.

2. Klyueva S.N., Shmel'kova T.P., Shchukovskaya T.N. Influence of CpG ODN 2006 oligodeoxynucleotide on cytokine production by blood cells of humans vaccinated against plague. *Meditsinskaya Immunologiya [Medical Immunology (Russia)]*. 2014; 16(6):531–8. DOI: 10.15789/1563-0625-2014-6-531-538.

3. Zakharov A.V. [Regarding immunization against plague of the personnel from the Ural Plague Control Station]. *Karantinnye i Zoonoznyye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. 2013; 1(27):57–61.

4. Kravtsov A.L., Shmelkova T.P., Shchukovskaya T.N. [Influence of the Anti-Plague Vaccination on the Functional Activity of Human Innate Immunity Cells]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2011; 1:77–80. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-77-80.

5. Gostischeva S.E., Abzaeva N.V., Kovalev D.A., Ponomarenko D.G., Siritsa Yu.V., Rakitina E.L., Afanasyev E.N., Kostuchenko M.V. [Optimization of the method of obtaining pestine PP and studying its specific activity *in vitro*]. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2018; 8(1):85–90. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-85-90.

6. Protein structure discovery. (Cited 01 Oct 2019). [Internet]. Available from: <http://www.bionet.sccc.ru/psd/cgi-bin/programs/Allpred/allpred.cgi>.

7. Bragin A.O., Demenkov P.S., Ivanisenko V.A. [Protein allergenicity prediction on the base of discontinuous peptides]. *Vavilovskiy Zhurnal Genetiki i Selektitsii [Vavilov Journal of Genetics and Selection]*. 2011; 15(3):462–8.

8. Bragin A.O., Demenkov P.S., Tiis E.S., Hoveschtadt R., Ivanisenko V.A., Kolchanov N.A. [Computerized analysis of the relationship between allergenicity of microorganisms and their habitats]. *Vavilovskiy Zhurnal Genetiki i Selektitsii [Vavilov Journal of Genetics and Selection]*. 2012; 16(4/1):784–90.

9. Bragin A.O., Sokolov V.S., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Bragina E.Yu., Matushkin Yu.G., Ivanisenko V.A. [Prediction of Bacterial and Archaeal Allergenicity with AllPred Program]. *Molekulyarnaya Biologiya [Molecular Biology]*. 2018; 52(2):326–32. DOI: 10.7868/S0026898418020179.

10. NCBI. Protein. (Cited 01 Oct 2019). [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=Yersinia+Pestis+EV>.

11. Goodman R.E., Ebisawa M., Ferreira F., Sampson H.A., van Ree R., Vieths S., Baumert J.L., Bohle B., Lalithambika S., Wise J., Taylor S.L. AllergenOnline: A peer-reviewed, curated allergen database to assess novel food proteins for potential cross-reactivity. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016; 60(5):1183–98. DOI: 10.1002/mnfr.201500769.

12. Allergenic Protein Sequence Searches. (Cited 01 Oct 2019). [Internet]. Available from: <http://www.allergenonline.org/database-fasta.shtml>.

13. Pearson W.R. Effective protein sequence comparison. *Methods Enzymol.* 1996; 266:227–58. DOI: 10.1016/S0076-6879(96)66017-0.

14. Yu C.S., Chen Y.C., Lu C.H., Hwang J.K. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics.* 2006; 64(3):643–51. DOI: 10.1002/prot.21018.

15. Molecular Bioinformatics Center. CELLO v2.5: sub-CELLular LOCALization predictor. (Cited 01 Oct 2019). [Internet]. Available from: <http://cello.life.nctu.edu.tw/>.

16. Odinkov G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Cherkasov A.V., Shavina N.Yu., Kuttyrev V.V. [Analysis of the genome wide sequence of *Yersinia pestis* strains based on the consecutive 680-SNP algorithm]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; 3:49–54. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-3-49-54.

17. Johansson S.G.O. A revised nomenclature for allergy – condensed version of the EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy Clin. Immunol. Intern.* 2002; 14(6):279–87.

18. Fedoseeva V.N. [Allergenic properties of bacteria]. *Rossiyskiy Allergologicheskiy Zhurnal [Russian Journal of Allergy]*. 2005; 3:3–11

19. Kolkhir P.V. [Evidence-Based Allergiology-Immunology]. Moscow: "Practice Medicine"; 2010. 527 p.

## Authors:

*Sutyagin V.V.* Taldykorgan Plague Control Station. Republic of Kazakhstan, 004000, Taldykorgan, 104, N. Nazarbayev Ave. E-mail: vit197803@mail.ru.

*Kovaleva G.G.* National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections named after M. Aykimbaev. Republic of Kazakhstan, 050054, Almaty, Zhahanger St., 14. E-mail: gkovaleva@kscqzd.kz.

## Об авторах:

*Сутягин В.В.* Талдыкорганская противочумная станция. Республика Казахстан, 004000, Талдыкорган, пр. Н. Назарбаева, 104. E-mail: vit197803@mail.ru.

*Ковалёва Г.Г.* Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева. Республика Казахстан, 050054, Алматы, ул. Жахангер, 14. E-mail: gkovaleva@kscqzd.kz.

Поступила 05.11.19.

Отправлена на доработку 15.11.19.

Принята к публ. 28.11.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-102-108

УДК 616.98:578.8(571.6)

Л.Н. Яшина<sup>1</sup>, Н.А. Сметанникова<sup>1</sup>, Г.Г. Компанец<sup>2</sup>, Н.И. Здановская<sup>3</sup>, Л.И. Иванов<sup>3</sup>**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ПАТОГЕННЫХ ХАНТАВИРУСОВ  
НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РОССИИ, 2015–2018 гг.**<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Российская Федерация;<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток, Российская Федерация; <sup>3</sup>ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция», Хабаровск, Российская Федерация

Патогенные хантавирусы, принадлежащие к семейству *Hantaviridae* рода *Orthohantavirus*, широко распространены во многих регионах мира и являются возбудителями геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) в Европе и Азии. На Дальнем Востоке России возбудителями ГЛПС являются три хантавируса: Хантаан (HTNV), Амур (AMRV) и Сеул (SEOV) – при этом в регионе циркулирует еще семь хантавирусов, значение которых в патологии человека остается неисследованным. **Цель работы** – генетическое типирование возбудителей ГЛПС, циркулировавших на Дальнем Востоке России в 2015–2018 гг. **Материалы и методы.** Для исследования использована кровь 64 больных ГЛПС, проживающих на территории Еврейской АО, Приморского и Хабаровского краев. Все образцы проанализированы методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием и филогенетическим анализом. **Результаты и обсуждение.** Генотипированы 19 РНК изолятов хантавирусов от больных ГЛПС. Возбудителями заболевания явились три патогенных хантавируса: HTNV (13 РНК изолятов), AMRV (3 изолята), SEOV (3 изолята). Установлено, что среди исследованных образцов вирус HTNV представлен тремя генетическими вариантами, вирус AMRV – двумя вариантами, вирус SEOV – одним вариантом, более близким к штаммам из Юго-Восточной Азии, чем из приграничных стран.

*Ключевые слова:* хантавирус, ГЛПС, Дальний Восток.

Корреспондирующий автор: Яшина Людмила Николаевна, e-mail: yashina@vector.nsc.ru.

*Для цитирования:* Яшина Л.Н., Сметанникова Н.А., Компанец Г.Г., Здановская Н.И., Иванов Л.И. Молекулярная эпидемиология патогенных хантавирусов на Дальнем Востоке России, 2015–2018 гг. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 4:102–108. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-102-108L.N. Yashina<sup>1</sup>, N.A. Smetannikova<sup>1</sup>, G.G. Kompanets<sup>2</sup>, N.I. Zdanovskaya<sup>3</sup>, L.I. Ivanov<sup>3</sup>**Molecular Epidemiology of Pathogenic Hantaviruses in the Far East of Russia, 2015–2018**<sup>1</sup>State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol’sovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;<sup>2</sup>G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;<sup>3</sup>Khabarovsk Plague Control Station, Khabarovsk, Russian Federation

**Abstract.** Human pathogenic hantaviruses, belonging to the family *Hantaviridae*, genus *Orthohantavirus*, are disseminated worldwide and cause hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Europe and Asia. In the Far East of Russia Hantaan (HTNV), Amur (AMRV) and Seoul (SEOV) viruses are etiologic agent of HFRS, while the human pathogenic potential of other seven hantaviruses, circulating in this region, has not been researched adequately yet. **Objective of the study** was genetic identification of hantaviruses, associated with HFRS in the Far East of Russia during 2015–2018. **Materials and methods.** Blood samples of 64 HFRS patients from Jewish Autonomous Region, Khabarovsk and Primorsky Territories were analyzed for hantavirus RNA using reverse transcription polymerase chain reaction. **Results and discussion.** A total of 19 viral RNA isolates from HFRS patients were genetically typed. Etiologic agents of HFRS were three pathogenic hantaviruses: HTNV (13 isolates), AMRV (3 isolates), SEOV (3 isolates). Three genetic lineages were identified among HTNV, two lineages among AMRV. One genetic variant of SEOV virus was identified among HFRS patients, which was more close to the strains from South-Eastern Asia than to those from the neighboring countries.

*Key words:* hantavirus, HFRS, Far East.*Conflict of interest:* The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Lyudmila N. Yashina, e-mail: yashina@vector.nsc.ru.

*Citation:* Yashina L.N., Smetannikova N.A., Kompanets G.G., Zdanovskaya N.I., Ivanov L.I. Molecular Epidemiology of Pathogenic Hantaviruses in the Far East of Russia, 2015–2018. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:102–108. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-102-108

Received 29.10.19. Revised 25.11.19. Accepted 26.11.19.

Хантавирусы, принадлежащие к семейству *Hantaviridae* рода *Orthohantavirus*, широко распространены во многих регионах мира и являются возбудителями двух клинически различных форм заболевания человека: геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) в Европе и Азии и хантавирусного кардиолегочного синдрома (ХЛС) в

Северной и Южной Америке [1]. Патогенные хантавирусы, природным резервуаром которых являются различные виды грызунов, вызывают заболевания человека различной степени тяжести с летальностью до 12 % для ГЛПС и 40 % для ХЛС. Оба заболевания являются острыми лихорадочными инфекциями, как правило, вызванными вдыханием аэрозолей

или пыли, контаминированной выделениями грызунов. Для ГЛПС характерны почечные нарушения и геморрагические проявления, которые варьируют от петехий до тяжелых внутренних кровотечений. ХЛС проявляется в форме пневмонии и сердечно-сосудистых нарушений.

ГЛПС регистрируется в различных географических регионах Российской Федерации и занимает одно из первых мест среди всех природно-очаговых заболеваний человека в России с регистрацией в отдельные годы от 4605 до 20921 случая (информация Госкомсанэпиднадзора, 1997–2007 гг.). Показано, что основным возбудителем ГЛПС на территории Европейской части России является вирус Пуумала (PUUV), циркулирующий в популяциях рыжих полевков, и 3 % случаев ГЛПС ассоциированы с вирусом Добрава-Белград (DOBV), носителями которого являются два вида мышей рода *Apodemus* – *A. agrarius agrarius* и *A. ponticus* [2, 3]. На Дальнем Востоке заболевание ГЛПС характеризуется значительной тяжестью по сравнению с заболеваемостью на европейской территории, тяжелые и средне-тяжелые формы в регионе составляют более 80 % [4].

Ранее при молекулярно-генетическом исследовании образцов крови больных ГЛПС из очагов Приморского и Хабаровского краев установлено, что возбудителями ГЛПС являются три вида хантавирусов [5]. Наряду с генетическими вариантами известных хантавирусов Хантаан (HTNV) и Сеул (SEOV), выявлен новый для рода *Hantavirus* вид – Амур (AMRV), названный по месту его выделения.

РНК изоляты вируса AMRV выделены от больных со средней и тяжелой формой ГЛПС в тех же очагах, где одновременно циркулировал HTNV. На основании сравнения нуклеотидных последовательностей фрагментов РНК, изолированных из крови больных ГЛПС и органов грызунов (носителей вируса), природным резервуаром вируса AMRV установлена восточно-азиатская мышь (*A. peninsulae*) [6].

Проведенные исследования по выявлению нового патогенного вируса на территории Дальнего Востока России привлекли значительный интерес зарубежных и российских исследователей. В последующих работах установлено широкое распространение вируса AMRV на территории Китая и Кореи [7, 8]. Кроме того, показано, что новый вирус является и новым серотипом. Отличие вируса AMRV от HTNV подтверждено при исследовании штаммов, выделенных от больных и грызунов в реакции нейтрализации [9]. Совокупность полученных нами и другими исследователями данных подтвердила принадлежность вируса AMRV к новому виду рода *Hantavirus*. Установлено, что доля вируса AMRV в структуре заболеваемости ГЛПС в Приморском крае России составляла 56 % [4]. Анализ РНК изолятов от *A. peninsulae*, отловленных на территории Приморского и Хабаровского краев, выявил циркуляцию четырех филогенетически различающихся вариантов вируса AMRV. В 2017 г. международный комитет по таксономии вирусов принял но-

вые критерии межвидового различия хантавирусов, следствием которых стало включение вируса AMRV в состав вида *Hantaan orthohantavirus*, как отдельного генетического варианта [10].

Исследование изолятов хантавируса, циркулирующего в популяциях полевой мыши (*A. agrarius*) показало, что природным резервуаром дальневосточного варианта вируса HTNV являлась полевая мышь *A. agrarius manchuricus*. Этот вывод согласуется с результатами, полученными при исследовании *A. agrarius manchuricus* на территории Кореи и Китая [7, 11].

При анализе материала от серых крыс (носителей вируса SEOV) и больных ГЛПС установлено, что генетический вариант из Владивостока имел общее происхождение с вариантом вируса, циркулирующего в странах Юго-Восточной Азии (Камбоджа, Вьетнам и Сингапур) [12].

Изучено генетическое многообразие хантавирусов, циркулирующих в других видах мелких млекопитающих Дальнего Востока, для которых не установлена связь с заболеваниями человека. Долгое время считалось, что источником генетически различающихся вирусов Хабаровск (KHAV) и Владивосток (VLAV), циркулирующих на территории Дальнего Востока, является дальневосточная полевка (*Microtus fortis*) [13]. Сравнительный анализ РНК изолятов вирусов, циркулирующих в популяциях полевков рода *Microtus*, и митохондриальной ДНК носителей вируса показал, что у вирусов имеются разные природные резервуары: *M. fortis* для вируса VLAV и *M. maximowiczii* для вируса KHAV [14]. Эти данные подтверждены результатами исследований вирусов на территории Китая и Внутренней Монголии [15]. Циркуляцию KHAV и VLAV на территории Амурской области, Еврейской автономной области (АО) и Хабаровского края поддерживают *M. maximowiczii* и *M. fortis* соответственно. В Приморском крае циркулирует вирус VLAV, хантавирус KHAV в этом регионе не обнаружен.

На территории азиатской части континента носителями PUUV-подобного вируса являются красно-серые и красные полевки [16]. Ранее показано, что в красно-серых полевках на острове Хоккайдо в Японии циркулирует вирус HOKV [17]. Получено молекулярное доказательство циркуляции вируса HOKV среди *Myodes rufocanus* на Дальнем Востоке России и в Сибири [18]. Согласно новым критериям, вирус HOKV отнесен к виду *Puumala orthohantavirus* [10], однако до сих пор не решен вопрос о его значении в патологии человека.

В последнее десятилетие хантавирусы выявлены в новых природных резервуарах: насекомоядных и рукокрылых [19]. На Дальнем Востоке в популяциях бурозубок рода *Sorex* установлена циркуляция четырех видов хантавирусов: Лена (LENV), Артыбаш (ARTV), Кенкеме (KKMV) и Якеши (YKSV) [20]. Значение новых хантавирусов в патологии человека не изучено.

**Целью** исследований явился генетический анализ патогенных хантавирусов, циркулировавших на Дальнем Востоке в 2015–2018 гг. Использован подход, потенциально позволяющий выявлять в образцах все циркулирующие в дальневосточном регионе вирусы: патогенные вирусы (HTNV, AMRV и SEOV) и вирусы с неисследованным патогенным потенциалом (HOKV, KHAV, VLAV, LENV, ARTV, KKMV и YKSV).

### Материалы и методы

Клинический диагноз «ГЛПС» или «подозрение на ГЛПС» у больных из очагов Дальнего Востока подтвержден увеличением титров специфических иммуноглобулинов в парных сыворотках крови с использованием антигенов вирусов HTNV, SEOV и PUUV. Специфические антитела определяли непрямой методом флуоресцирующих антител (НМФА), используя диагностикум ГЛПС поливалентный культуральный, выпускаемый ФГУП «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» (Москва).

Для исследования вирусов, возбудителей ГЛПС, в период 2015–2018 гг. отобрано 64 образца крови больных ГЛПС из очагов Приморского (7), Хабаровского (57) краев и Еврейской АО (1). Основным критерием отбора стал лабораторно подтвержденный диагноз ГЛПС и наличие образцов крови, взятых не позднее 16 дней после начала заболевания. От всех больных, участвующих в исследовании, получено информированное согласие.

Сгустки крови больных ГЛПС помещали в стабилизирующий раствор RNAlater (QIAGEN GmbH, Германия) для последующего выделения РНК и ее анализа методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

Вирусную кДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы RevertAid Premium (Thermo Scientific, США) и родоспецифического праймера HPS (5'-TAGTAGTAGACTCC). Продукты двухраундовой амплификации получали с использованием серии праймеров по стандартному протоколу с использованием Hot start Taq ДНК-полимеразы производства фирмы «Сибэнзим» (Новосибирск). Серия праймеров и условия проведения реакции описаны ранее [21].

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма MUSCLE в программе MEGA7. Для построения филогенетических деревьев использован метод максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с моделью эволюции Tamura-Nei. Вычисления проводили для 1000 итераций.

### Результаты и обсуждение

Все образцы протестированы методом ОТ-ПЦР с использованием родоспецифических праймеров

для L-сегмента генома [21]. РНК хантавирусов выявлена в 19 образцах (таблица). Полученные нуклеотидные последовательности фрагмента L-сегмента генома депонированы в банке данных GenBank под номерами МК189282–МК189300.

Анализ последовательностей L-сегмента (позиции 2969–3314) генома новых РНК изолятов от больных ГЛПС показал их принадлежность к трем видам хантавирусов HTNV, AMRV, SEOV, ранее выявленных от больных ГЛПС и их природных носителей на Дальнем Востоке России и в соседних странах – Китае и Корее [5, 7, 8] (рисунок). Вирус HTNV обнаружен у 13 больных ГЛПС. Филогенетический анализ выявил наличие трех генетических вариантов вируса среди новых РНК изолятов (рисунок). Установлено, что вирусные последовательности варианта HTNV-1 относятся к дальневосточному генетическому варианту HTNV и отличаются от опубликованных РНК изолятов вируса на 1,6–3,2 % по нуклеотидным последовательностям L-сегмента (0–1,7 % по кодируемому аминокислотным), тогда как от большинства штаммов вируса HTNV из Китая и Кореи – на 12,3–20,3 % (1,7 %). Один из опубликованных китайских изолятов из приграничной провинции Фуян близок к варианту HTNV-1, различие нуклеотидных последовательностей не превышает 4,1 %, а кодируемые аминокислотные последовательности идентичны. Все РНК изоляты варианта HTNV-1 выявлены от больных ГЛПС – жителей Хабаровского края. Ко второму варианту HTNV-2 отнесены два РНК изолята (1543 и 1721), отличающиеся от изолятов варианта HTNV-1 двумя и одной заменой соответственно, в кодируемой последовательности РНК-зависимой РНК полимеразы. Единственный новый РНК изолят из Еврейской АО (1516) отнесен к варианту HTNV-3. Нуклеотидная последовательность близка (0,3 % различий) к ранее идентифицированному изоляту Dubovoe JAO 424-19-15 (GenBank) из того же региона, тогда как различие с РНК изолятами вариантов HTNV-1 и HTNV-2 составило 3,8–6,0 %, при этом не выявлено различий в аминокислотных последовательностях.

Среди РНК изолятов вируса AMRV выявлено два генетических варианта. Изолят 7219 из Надеждинского района Приморского края, отнесенный к варианту AMRV-1, был близок к штамму H8205, изолированному от больного ГЛПС из Китая. Изоляты 1858 и 7194 из Хабаровского и Приморского краев отнесены к варианту AMRV-2. Различие нуклеотидных последовательностей двух вариантов составляло 12,0–13,6 %. Эти цифры сравнимы с различиями вариантов AMRV-1 и AMRV-2 с остальными штаммами вируса AMRV из Китая и Кореи – 11,3–15,2 %. При этом аминокислотные последовательности всех российских и китайских изолятов на анализируемом участке были идентичными.

Три изолята вируса SEOV, относящиеся к ранее идентифицированному варианту VDV [12], филогенетически близки со штаммами вируса из Юго-

Описание образцов крови от больных ГЛПС из ЕАО, Хабаровского и Приморского краев России и результаты тестирования  
 Description of blood samples from HFRS patients from Jewish Autonomous Region (JAR), Khabarovsk and Primorsky Territories of Russia and results of testing

№ пациента Patient's No	Место жительства / Residence	Возраст (лет) Age (years)	Дата заболевания (мес.год) Date of infection (month.year)	нМФА Indirect fluorescent antibody method	ОТ-ПЦР RT-PCR
<b>2015</b>					
1532	Хабаровск / Khabarovsk	59	11.15	1:4096	HTNV
<b>2016</b>					
503	Хабаровский край / Khabarovsk Territory	36	05.16	1:16000	HTNV
1721	Хабаровск / Khabarovsk	52	10.16	1:1024	HTNV
1722	Хабаровск / Khabarovsk	32	10.16	1:16384	HTNV
1723	Хабаровск / Khabarovsk	29	10.16	1:1024	HTNV
1739	Хабаровск / Khabarovsk	78	10.16	1:512	HTNV
1799	Хабаровск / Khabarovsk	67	11.16	1:16384	HTNV
1805	Хабаровск / Khabarovsk	62	10.16	1:4096	HTNV
1858	Хабаровский край / Khabarovsk Territory	61	11.16	1:512	AMRV
1923	Хабаровск / Khabarovsk	32	12.16	1:1024	HTNV
<b>2017</b>					
1516	ЕАО / JAR	67	10.17	1:256	HTNV
1543	Хабаровск / Khabarovsk	42	10.17	1:1024	HTNV
1612	Хабаровск / Khabarovsk	30	11.17	1:1024	HTNV
1619	Хабаровск / Khabarovsk	30	12.17	1:256	HTNV
<b>2018</b>					
7139	Приморский край / Primorsky Territory	н.д. / n.d.	03.18	1:1024	SEOV
7152	Владивосток / Vladivostok	н.д. / n.d.	04.18	1:512	SEOV
7194	Владивосток / Vladivostok	н.д. / n.d.	06.18	1:512	AMRV
7219	Приморский край / Primorsky Territory	н.д. / n.d.	07.18	1:512	AMRV
7259	Владивосток / Vladivostok	н.д. / n.d.	08.18	1:2048	SEOV

Примечание: н.д. – нет данных.  
 Note: n.d. – no data available.

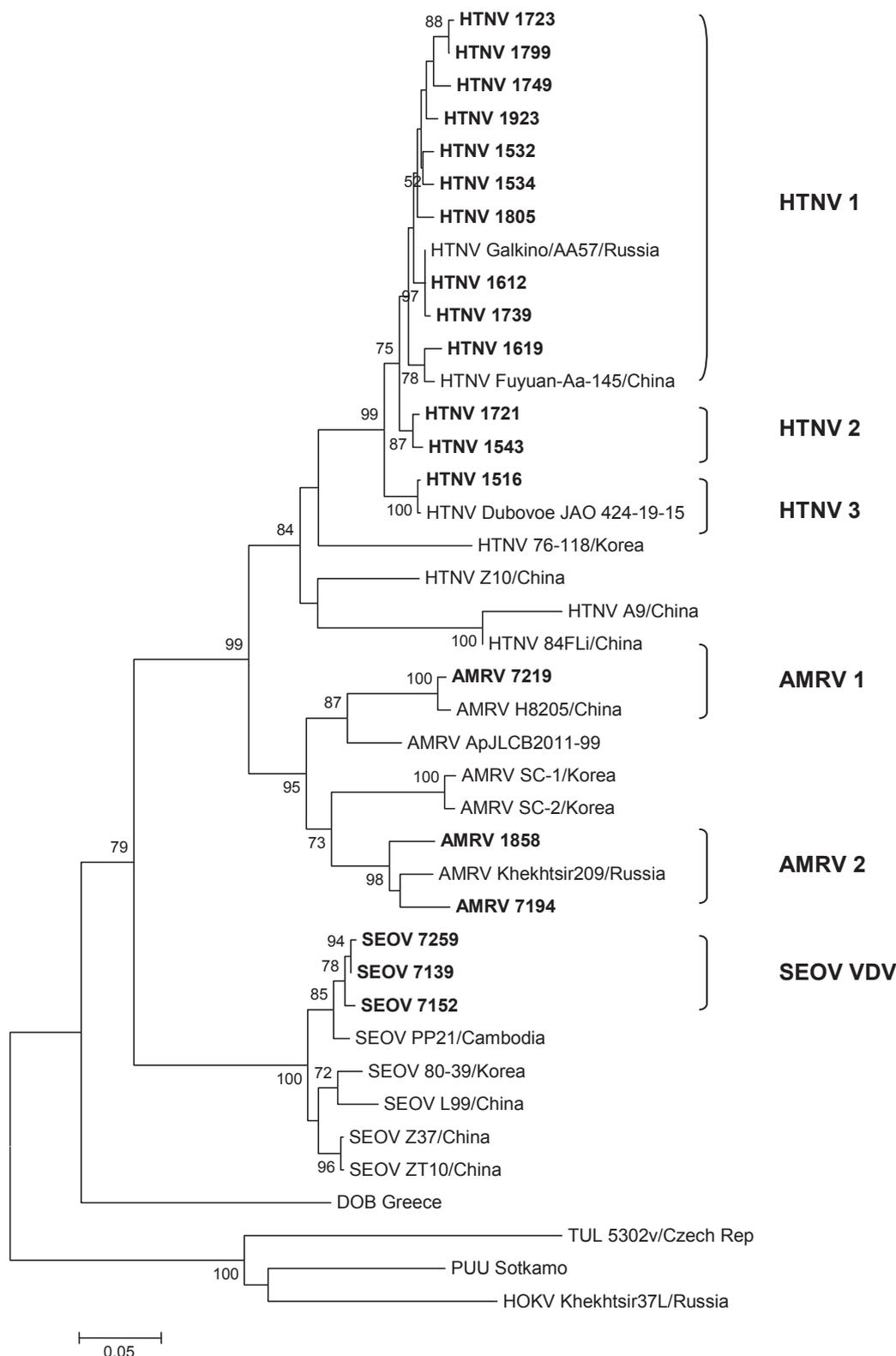
Восточной Азии – из Камбоджи и Вьетнама. Вариант вируса SEOV, циркулирующий среди серых крыс во Владивостоке, отличается от вариантов вируса из приграничных стран (Китая и Кореи) и, как предполагалось ранее, завезен из Юго-Восточной Азии на кораблях.

Полученные данные согласуются с ранее опубликованной информацией о циркуляции трех патогенных хантавирусов на территории Приморского и Хабаровского краев [5, 9]. Ранее при анализе образцов от восточно-азиатской лесной мыши *A. peninsulae* – природного хозяина вируса AMRV, установлено существование четырех вариантов вируса. В настоящем исследовании два из этих вариантов выявлены от больных ГЛПС. Два других варианта вируса AMRV циркулируют в удаленных районах Хабаровского края (Амурском и Солнечном) и не представлены в исследованной выборке образцов крови от больных ГЛПС.

Не менее двух вариантов вируса HTNV выявлено ранее при анализе образцов от природного хозяина вируса – полевой мыши *A. agrarius*. Анализ образцов от больных ГЛПС установил наличие трех

вариантов вируса HTNV, причем третий выявлен на приграничной с Китаем территории Еврейской АО и генетически близок к изолятам из Китая.

Ранее опубликованные данные генетического анализа циркулирующих в дальневосточном регионе хантавирусов от больных ГЛПС и их природных носителей основаны на исследовании других фрагментов вирусного генома. Главным образом это связано с использованием выбранных авторами видоспецифических праймеров, пригодных для анализа групп вирусов HTNV/AMRV/SEOV, либо PUUV/KHAV/VLAV/HOKV [5]. В данной работе для тестирования образцов использованы родоспецифические праймеры, позволяющие выявлять значительно более широкий набор известных хантавирусов, циркулирующих как среди грызунов, так и среди насекомых и рукокрылых [21]. Использование родоспецифических праймеров дает возможность выявлять более широкий набор потенциальных возбудителей хантавирусной инфекции. Поскольку клинические проявления инфекции для различных хантавирусов существенно разнятся, важным фактором является критерий отбора образцов для анализа. В исследованной выборке



Филогенетическое дерево, отображающее взаимосвязи хантавирусов от больных ГЛПС из дальневосточных регионов Российской Федерации и штаммов из других регионов мира. Дерево построено на основе нуклеотидных последовательностей L-сегмента генома (позиции 2969–3314) с использованием метода NJ, индексы поддержки рассчитаны для 1000 повторов. Жирным шрифтом выделены исследованные варианты хантавирусов

Phylogenetic tree reflecting the interactions between hantaviruses from HFRS patients from Far Eastern regions of Russia and strains from other regions of the world. The dendrogram is constructed on the basis of nucleotide sequences of L-segment of the genome (positions 2969–3314) using NJ method, support indices are calculated for 1000 repeats. Studied variants of Hantaviruses are shown in bold

образцов представлены случаи средней и тяжелой форм ГЛПС, характерных для дальневосточного региона Российской Федерации. Кроме того, для подтверждения клинического диагноза использо-

ван диагностиком на основе вирусов HTNV/SEOV/PUUV. Новые хантавирусы, выявленные среди насекомых и рукокрылых, существенно отличаются по своим генетическим и аминокислотным последовательностям, и как следствие, по антигенным характеристикам, и для своего серологического выявления требуют разработки специфических тест-систем. На основании этих данных можно предполагать, что среди стандартной выборки образцов от больных ГЛПС маловероятно обнаружение новых патогенных хантавирусов, вызывающих клинические проявления, отличающиеся от классической формы ГЛПС, либо имеющих отличающиеся антигенные характеристики.

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

### Список литературы

- Jonsson C.B., Figueiredo L.T.M., Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010; 23(2):412–41. DOI: 10.1128/CMR.00062-09.
- Ткаченко Е.А., Бернштейн А.Д., Дзагурова Т.К., Башкирцев В.Н., Седова Н.С., Малкин А.Е., Горбачкова Е.А., Балакирев А.Е., Дроздов С.Г., Сикора И.В., Шукина И.А., Савельев С.И., Богатова И.С., Транквилевский Д.В., Чубирко М.И., Торубарова Е.С., Нургалева Р.Г., Минин Г.Д., Загидуллин И.М., Иванова А.А., Жуков В.И., Морозов С.Г., Хайбулина С.Ф., Морзунов С.П. Сравнительный анализ эпидемических вспышек геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызванных вирусами Пуумала и Добрава/Белград. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2005; 4:28–34.
- Klempa B., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Yunicheva Y.V., Morozov V.G., Okulova N.M., Slyusarenko G.P., Smirnov A., Kruger D.H. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia. *Emerg. Inf. Dis.* 2008; 14(4):617–25. DOI: 10.3201/eid1404.071310.
- Слонова Р.А., Кушнарева Т.В., Компанец Г.Г., Максема И.Г., Симонова Т.Л., Симонов С.Б. Хантавирусная инфекция в Приморском крае – эпидемиологическая ситуация в очагах циркуляции разных серотипов вируса. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2006; S3:74–7.
- Yashina L.N., Patrushev N.A., Ivanov L.I., Slonova R.A., Mishin V., Kompanez G.G., Zdanovskaya N.I., Kuzina I.I., Safronov P.F., Chizhikov V.E., Schmaljohn C., Netesov S.V. Genetic diversity of hantaviruses associated with hemorrhagic fever with renal syndrome in the Far East of Russia. *Virus Res.* 2000; 70(1–2):31–44. DOI: 10.1016/s0168-1702(00)00203-3.
- Yashina L., Mishin V., Zdanovskaya N., Schmaljohn C., Ivanov L. A newly discovered variant of a hantavirus in *Apodemus peninsulae*, Far Eastern Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7:912–913.
- Kariwa H., Yoshimatsu K., Arikawa J. Hantavirus infection in East Asia. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 30(5–6): 341–56. DOI: 10.1016/j.cimid.2007.05.011.
- Zhang Y.Z., Zou Y., Yao L.S., Hu G.W., Du Z.S., Jin L.Z., Liu Y.Y., Wang H.X., Chen X., Chen H.X., Fu Z.F. Isolation and characterization of hantaviruses carried by *Apodemus peninsulae* in Jilin, China. *J. Gen. Virol.* 2007; 88(Pt4):1295–331. DOI: 10.1099/vir.0.82534-0.
- Kariwa H., Yoshikawa K., Tanikawa Y., Seto T., Sanada T., Saasa N., Ivanov L.I., Slonova R., Zakharycheva T.A., Nakamura I., Yoshimatsu K., Arikawa J., Yoshii K., Takashima I. Isolation and characterization of hantaviruses in Far East Russia and etiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in the region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2012; 86(3):545–53. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.11-0297.
- Maes P., Adkins S., Alkhovskiy S.V., Avšič-Zupanc T., Ballinger M.J., Bente D.A., Beer M., Bergeron E., Blair C.D., Briese T., Buchmeier M.J., Burt F.J., Calisher C.H., Charrel R.N., Choi I.R., Clegg J.C.S., Juan Carlos de la Torre, Xavier de Lamballerie, DeRisi J.L., Digiaro M., Drebot M., Ebihara H., Elbeaino T., Ergünay K., Fulhorst C.F., Garrison A.R., Gao G.F., Gonzalez J.-P.J., Groschup M.H., Günther S., Haenni A.-L., Hall R.A., Hewson R., Hughes H.R., Jain R.K., Jonson M.G., Junglen S., Klempa B., Klingström J., Kormelink R., Lambert A.J., S.A. Langevin, Lukashевич I.S., Marklewitz M., Giovanni P., Martelli, Mielke-Ehret N., Mirazimi A., Mühlbach H.-P., Naidu R., Nunes M.R.T., Palacios G., Papa A., Paweska J.T., Peters C.J., Plyusnin A., Radoshitzky S.R., Resende R.O., Romanowski V., Sall A.A., Salvato M.S., Sasaya T., Schmaljohn

- Shi X., Shirako Y., Simmonds P., Sironi M., Song J.-W., Spengler J.R., Stengle M.D., Tesh R.B., Turina M., Wei T., Whitfield A.E., Yeh S.-D., Zerbini F.M., Zhang Y.-Z., Zhou X., Kuhn J.H. Taxonomy of the order Bunyavirales: Second update 2018. *Arch. Virol.* 2019; 164(3):927–41. DOI: 10.1007/s00705-018-04127-3.
- Zou Y., Hu J., Wang Z.X., Wang D.M., Li M.H., Ren G.D., Duan Z.X., Fu Z.F., Plyusnin A., Zhang Y.Z. Molecular diversity and phylogeny of Hantaan virus in Guizhou, China: evidence for Guizhou as a radiation center of the present Hantaan virus. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt8):1987–97. DOI: 10.1099/vir.0.2008/000497-0.
- Слонова Р.А., Яшина Л.Н., Компанец Г.Г., Мишин В.А. Антигенная и генетическая характеристика штаммов вируса Сеул – возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Вопросы вирусологии.* 2003; 48(3):10–4.
- Hörling J., Chizhikov V., Lundkvist A., Jonsson M., Ivanov A., Dekonenko A., Niklasson B., Dzagurova T., Peters C.J., Tkachenko E., Nichol S. Khabarovsk virus: a phylogenetically and serologically distinct hantavirus isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east Russia. *J. Gen. Virol.* 1996; 77(Pt):687–94. DOI: 10.1099/0022-1317-77-4-687.
- Яшина Л.Н., Иванов Л.И., Слонова Р.А., Компанец Г.Г., Гуроров В.В., Кушнарева Т.В., Высочина Н.П., Абрамов С.А., Дупал Т.А., Пуховская Н.М., Здановская Н.И. Хантавирусы, циркулирующие в полевках *Microtus fortis* и *Microtus maxmowiczii*. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2008; 2:47–9.
- Zou Y., Wang J.B., Gaowa H.S., Yao L.S., Hu G.W., Li M.H., Chen H.X., Plyusnin A., Shao R., Zhang Y.Z. Isolation and genetic characterization of hantaviruses carried by *Microtus voles* in China. *J. Med. Virol.* 2008; 80(4):680–8. DOI: 10.1002/jmv.21119.
- Иванов Л.И., Здановская Н.И., Ткаченко Е.А., Резапкин Г.В., Рыльцева Е.В., Гапонова Л.К., Воробьева Р.Н., Волков В.И. Ареал и природные резервуары вируса геморрагической лихорадки с почечным синдромом на Дальнем Востоке России. *Вопросы вирусологии.* 1989; 34(5):595–8.
- Kariwa H., Yashimatsu K., Sawabe J., Yokota E., Arikawa J., Takashima I., Fukushima H., Lundkvist A., Shubin F.N., Isachkova L.M., Slonova R.A., Leonova G.N., Hashimoto N. Genetic diversities of hantaviruses among rodents in Hokkaido, Japan and Far East Russia. *Virus Res.* 1999; 59(2):219–28. DOI: 10.1016/s0168-1702(98)00141-5.
- Яшина Л.Н., Слонова Р.А., Олейник О.В., Кузина И.И., Кушнарева Т.В., Компанец Г.Г., Симонов С.Б., Симонова Т.Л., Морзунов С.П., Нетесов С.В. Новый генетический вариант вируса Пуумала в Приморье и его природный носитель, красносерая полевка *Clethrionomys rufocanus*. *Вопросы вирусологии.* 2004; 49(6):34–8.
- Zhang Y.Z. Discovery of hantaviruses in bats and insectivores and the evolution of the genus Hantavirus. *Virus Res.* 2014; 187:15–21.
- Yashina L.N., Kartashov M.Yu., Wang W., Li K., Zdanovskaya N.I., Ivanov L.I., Zhang Y.Z. Co-circulation of distinct shrew-borne hantaviruses in the far east of Russia. *Virus Res.* 2019; 272:197717. DOI: 10.1016/j.virusres.2019.197717.
- Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Denys C., Koivogui L., Jan ter Meulen, Krüger D.H. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12:838–40. DOI: 10.3201/eid1205.051487.

### References

- Jonsson C.B., Figueiredo L.T.M., Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010; 23(2):412–41. DOI: 10.1128/CMR.00062-09.
- Tkachenko E.A., Bernshtein A.D., Dzagurova T.K., Bashkirtsev V.N., Sedova N.S., Malkin A.E., Gorbachkova E.A., Balakirev A.E., Drozдов S.G., Sikora I.V., Shchukina I.A., Savel'ev S.I., Bogatova I.S., Trankvilevsky D.V., Chubirko M.I., Torubarova E.S., Nurgaleeva R.G., Minin G.D., Zagiduллин I.M., Ivanova A.A., Zhukov V.I., Morozov S.G., Haibulina S.F., Morzunov S.P. [Comparative analysis of epidemic outbreaks of hemorrhagic fever with renal syndrome, caused by Puumala, and Dobrava/Belgrade viruses]. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2005; 4:28–34.
- Klempa B., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Yunicheva Y.V., Morozov V.G., Okulova N.M., Slyusarenko G.P., Smirnov A., Kruger D.H. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia. *Emerg. Inf. Dis.* 2008; 14(4):617–25. DOI: 10.3201/eid1404.071310.
- Slonova R.A., Kushnareva T.V., Kompanets G.G., Maksema I.G., Simonova T.L., Simonov S.B. [Hantavirus infection in the Primorsky Territory – epidemiological situation in the foci, where various serotype circulate]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2006; S3:74–7.
- Yashina L.N., Patrushev N.A., Ivanov L.I., Slonova R.A., Mishin V., Kompanez G.G., Zdanovskaya N.I., Kuzina I.I., Safronov P.F., Chizhikov V.E., Schmaljohn C., Netesov S.V. Genetic diversity

- of hantaviruses associated with hemorrhagic fever with renal syndrome in the Far East of Russia. *Virus Res.* 2000; 70(1-2):31-44. DOI: 10.1016/S0168-1702(00)00203-3.
6. Yashina L., Mishin V., Zdanovskaya N., Schmaljohn C., Ivanov L. A newly discovered variant of a hantavirus in *Apodemus peninsulae*, Far Eastern Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7:912-913.
7. Kariwa H., Yoshimatsu K., Arikawa J. Hantavirus infection in East Asia. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 30(5-6): 341-56. DOI: 10.1016/j.cimid.2007.05.011.
8. Zhang Y.Z., Zou Y., Yao L.S., Hu G.W., Du Z.S., Jin L.Z., Liu Y.Y., Wang H.X., Chen X., Chen H.X., Fu Z.F. Isolation and characterization of hantaviruses carried by *Apodemus peninsulae* in Jilin, China. *J. Gen. Virol.* 2007; 88(Pt4):1295-331. DOI: 10.1099/vir.0.82534-0.
9. Kariwa H., Yoshikawa K., Tanikawa Y., Seto T., Sanada T., Saasa N., Ivanov L.I., Slonova R., Zakharycheva T.A., Nakamura I., Yoshimatsu K., Arikawa J., Yoshii K., Takashima I. Isolation and characterization of hantaviruses in Far East Russia and etiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in the region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2012; 86(3):545-53. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.11-0297.
10. Maes P., Adkins S., Alkhovsky S.V., Avšič-Zupanc T., Ballinger M.J., Bente D.A., Beer M., Bergeron E., Blair C.D., Briese T., Buchmeier M.J., Burt F.J., Calisher C.H., Charrel R.N., Choi I.R., Clegg J.C.S., Juan Carlos de la Torre, Xavier de Lamballerie, DeRisi J.L., Digiaro M., Drebot M., Ebihara H., Elbeaino T., Ergünay K., Fulhorst C.F., Garrison A.R., Gao G.F., Gonzalez J.-P.J., Groschup M.H., Günther S., Haenni A.-L., Hall R.A., Hewson R., Hughes H.R., Jain R.K., Jonson M.G., Junglen S., Klempa B., Klingström J., Kormelink R., Lambert A.J., S.A. Langevin, Lukashovich I.S., Marklewitz M., Giovanni P. Martelli, Mielke-Ehret N., Mirazimi A., Mühlbach H.-P., Naidu R., Nunes M.R.T., Palacios G., Papa A., Paweska J.T., Peters C.J., Plyusnin A., Radoshitzky S.R., Resende R.O., Romanowski V., Sall A.A., Salvato M.S., Sasaya T., Schmaljohn C., Shi X., Shirako Y., Simmonds P., Sironi M., Song J.-W., Spengler J.R., Stenglein M.D., Tesh R.B., Turina M., Wèi T., Whitfield A.E., Yeh S.-D., Zerbini F.M., Zhang Y.-Z., Zhou X., Kuhn J.H. Taxonomy of the order Bunyavirales: Second update 2018. *Arch. Virol.* 2019; 164(3):927-41. DOI: 10.1007/s00705-018-04127-3.
11. Zou Y., Hu J., Wang Z.X., Wang D.M., Li M.H., Ren G.D., Duan Z.X., Fu Z.F., Plyusnin A., Zhang Y.Z. Molecular diversity and phylogeny of Hantaan virus in Guizhou, China: evidence for Guizhou as a radiation center of the present Hantaan virus. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt8):1987-97. DOI: 10.1099/vir.0.2008/000497-0.
12. Slonova R.A., Yashina L.N., Kompanets G.G., Mishin V.A. Antigen and genetic characteristics of Seoul virus strains – agent of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2003; 48(3):10-4.
13. Hörning J., Chizhikov V., Lundkvist A., Jonsson M., Ivanov A., Dekonenko A., Niklasson B., Dzagurova T., Peters C.J., Tkachenko E., Nichol S. Khabarovsk virus: a phylogenetically and serologically distinct hantavirus isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east Russia. *J. Gen. Virol.* 1996; 77(Pt):687-94. DOI: 10.1099/0022-1317-77-4-687.
14. Yashina L.N., Ivanov L.I., Slonova R.A., Kompanets G.G., Gutorov V.V., Kushnareva T.V., Vysochina N.P., Abramov S.A., Dupal T.A., Pukhovskaya N.M., Zdanovskaya N.I. [Hantaviruses circulating in voles *Microtus fortis* and *Microtus maximowiczii*]. *Tikhookeansky Meditsinskii Zhurnal [Pacific Medical Journal]*. 2008; 2:47-9.
15. Zou Y., Wang J.B., Gaowa H.S., Yao L.S., Hu G.W., Li M.H., Chen H.X., Plyusnin A., Shao R., Zhang Y.Z. Isolation and genetic characterization of hantaviruses carried by *Microtus voles* in China. *J. Med. Virol.* 2008; 80(4):680-8. DOI: 10.1002/jmv.21119.
16. Ivanov L.I., Zdanovskaya N.I., Tkachenko E.A., Rezapkin G.V., Ryl'ceva E.V., Gaponova L.K., Vorob'eva R.N., Volkov V.I. [Areal and natural reservoirs of the virus of hemorrhagic fever with renal syndrome in the Far East of Russia]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 1989; 34(5):595-8.
17. Kariwa H., Yashimatsu K., Sawabe J., Yokota E., Arikawa J., Takashima I., Fukushima H., Lundkvist A., Shubin F.N., Isachkova L.M., Slonova R.A., Leonova G.N., Hashimoto N. Genetic diversities of hantaviruses among rodents in Hokkaido, Japan and Far East Russia. *Virus Res.* 1999; 59(2):219-28. DOI: 10.1016/S0168-1702-(98)00141-5.
18. Yashina L.N., Slonova R.A., Oleinik O.V., Kuzina I.I., Kushnareva T.V., Kompanets G.G., Simonov S.B., Simonova T.L., Morzunov S.P., Netesov S.V. [New genetic variant of Puumala virus in Primorye and its natural carrier, red-grey vole *Clethrionomys rufocanus*]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2004; 49(6):34-8.
19. Zhang Y.Z. Discovery of hantaviruses in bats and insectivores and the evolution of the genus Hantavirus. *Virus Res.* 2014; 187:15-21.
20. Yashina L.N., Kartashov M.Yu., Wang W., Li K., Zdanovskaya N.I., Ivanov L.I., Zhang Y.Z. Co-circulation of distinct shrew-borne hantaviruses in the far east of Russia. *Virus Res.* 2019; 272:197717. DOI: 10.1016/j.virusres.2019.197717.
21. Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Denys C., Koivogui L., Jan ter Meulen, Krüger D.H. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12:838-40. DOI: 10/3201/eid1205.051487.

**Authors:**

Yashina L.N., Smetannikova N.A. State Scientific Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Kompanets G.G. G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 1, Selskaya St., Vladivostok, Russian Federation.

Zdanovskaya N.I., Ivanov L.I. Khabarovsk Plague Control Station. 7, Sanytarny Lany, Khabarovsk, 680031, Russian Federation. E-mail: chum@chum.khv.ru.

**Об авторах:**

Яшина Л.Н., Сметанникова Н.А. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Компанец Г.Г. Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова. Российская Федерация, Владивосток, Сельская, 1.

Здановская Н.И., Иванов Л.И. Хабаровская противочумная станция. Российская Федерация, 680031, Хабаровск, Санитарный пер., 7. E-mail: chum@chum.khv.ru.

Поступила 29.10.19.

Отправлена на доработку 25.11.19.

Принята к публ. 26.11.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-109-112

УДК 616.98:579.841.95(470.63)

Е.В. Герасименко, Н.В. Цапко, О.А. Гнусарева, Г.П. Шкарлет, О.А. Белова

## ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПРИРОДНОГО ОЧАГА ТУЛЯРЕМИИ В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ ЗА 2010–2017 гг.

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

**Целью** исследования явилась оценка современной эпизоотологической обстановки по туляремии в Ставропольском крае. **Материалы и методы.** Обработаны данные лабораторных исследований полевого материала за 2010–2017 гг. биологическим методом и ПЦР. **Результаты и обсуждение.** Представлен анализ эпизоотологической обстановки за 2010–2017 гг. в Ставропольском крае. Установлен видовой состав и численность основных носителей туляремии в изучаемый период. Эпизоотическую активность очага определяют мыши рода *Sylvaemus*. Представлены данные о выделении штаммов от иксодовых клещей, мелких млекопитающих и объектов внешней среды. Зараженность возбудителем туляремии обнаружена у семи видов млекопитающих: малая лесная мышь (*S. uralensis*), обыкновенная полевка (*Microtus arvalis*), общественная полевка (*M. socialis*), домовая мышь (*Mus musculus*), малая белозубка (*Crocidura suaveolens*), южный еж (*Erinaceus roumanicus*), заяц-русак (*Lepus europaeus*). За период проведения эпизоотологического мониторинга в 2010–2017 гг. изолировано 37 штаммов возбудителя туляремии, в том числе от мелких млекопитающих – 12 (32,4 %), эктопаразитов – 9 (24,3 %), из объектов внешней среды – 16 (43,2 %). Все выделенные штаммы идентифицированы как *Francisella tularensis holarctica* биовар II, *ery*<sup>R</sup>.

**Ключевые слова:** мониторинг, природный очаг, туляремия, мелкие млекопитающие.

Корреспондирующий автор: Герасименко Екатерина Владимировна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Герасименко Е.В., Цапко Н.В., Гнусарева О.А., Шкарлет Г.П., Белова О.А. Эпизоотологический мониторинг природного очага туляремии в Ставропольском крае за 2010–2017 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:109–112. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-109-112

E.V. Gerasimenko, N.V. Tsapko, O.A. Gnusareva, G.P. Shkarlet, O.A. Belova

## Epizootiologic Monitoring of Natural Focus of Tularemia in the Stavropol Region in 2010–2017

“Stavropol Research Anti-Plague Institute”, Stavropol, Russian Federation

**Abstract. Objective** of the study was an assessment of the current epizootiological situation on tularemia in the Stavropol Region. **Materials and methods.** Processed were the data of laboratory investigations of the field material over the period of 2010–2017. All field samples were studied in the laboratories of the Stavropol Anti-Plague Institute using PCR and bioassay. **Results and discussion.** This paper presents the analysis of the epizootiological situation for the period of 2010–2017 in the Stavropol Region. The species composition and the number of the main carriers of tularemia have been established. Epizootic activity of the focus is defined by mice of the genus *Sylvaemus*. Data on the isolation of strains from ticks, small mammals and environmental objects are presented and processed. According to our studies, over the past seven years, infection with tularemia agent has been detected in seven species of mammals: *S. uralensis*, *Microtus arvalis*, *M. socialis*, *Mus musculus*, *Crocidura suaveolens*, *Erinaceus roumanicus*, *Lepus europaeus*. For the period of epizootic monitoring between 2010 and 2017 37 strains of the causative agent were isolated from small mammals – 12 (32.4 %), ectoparasites – 9 (24.3 %), and environmental objects – 16 (43.2 %). All isolated strains have been identified as *Francisella tularensis holarctica* biovar II, *ery*<sup>R</sup>.

**Key words:** monitoring, natural focus, tularemia, small mammals.

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

Corresponding author: Ekaterina V. Gerasimenko, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Citation: Gerasimenko E.V., Tsapko N.V., Gnusareva O.A., Shkarlet G.P., Belova O.A. Epizootiologic Monitoring of Natural Focus of Tularemia in the Stavropol Region in 2010–2017. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:109–112. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-109-112

Received 17.10.18. Revised 30.11.18. Accepted 29.12.18.

Впервые эпизоотии туляремии среди мелких млекопитающих и спорадические случаи заболевания людей в Ставропольском крае зарегистрированы в 1938 г. С тех пор туляремия в природном очаге не раз проявлялась в виде разлитых и локальных эпизоотий и сопутствующих им эпидемических осложнений. Многолетнее изучение показало, что в

Ставрополье существует обширный и стойкий природный очаг туляремии, имеющий полигостальный и поливекторный характер [1, 2].

Из 26 административных районов края 18 находятся на энзоотичной территории, в разные годы здесь регистрировались эпизоотии (выделение штаммов) различной интенсивности и/или зарегистрированы

случаи заболевания людей этой инфекцией [3, 4].

За последние 10 лет наиболее неблагополучными по туляремии являются девять районов: Андроповский, Петровский, Грачевский, Шпаковский, Ипатовский, Красногвардейский, Изобильненский, Минераловодский и Труновский. На данных территориях периодически регистрируются эпизоотии туляремии и случаи заболевания у людей. Кроме того, в городах регистрируются случаи заболевания туляремией среди охотников, выезжающих на охоту на энзоотичные территории [3].

По результатам учета мелких млекопитающих, их средняя численность в 2016 г. в Ставропольском крае составила 13,2 %, подъем численности в два раза по сравнению с предыдущими годами. На основании данного факта дан прогноз об увеличении эпизоотической активности и эпидемиологической опасности природного очага туляремии в осенне-зимний период 2016–2017 гг. Данный прогноз оправдался ухудшением эпидемиологической обстановки по туляремии в начале 2017 г.

В 2017 г. зарегистрировано 49 случаев заболевания туляремией, у 23 установлен охотничье-пищевой тип заболевания, связанный с разделкой зайцев охотниками и членами их семей. Водный тип заболевания людей установлен у тринадцати заболевших. Все случаи заболевания связаны с употреблением инфицированной воды из местных водопроводов. В остальных двенадцати случаях имел место бытовой тип, а у одного заболевшего тип не установлен [5].

Природный очаг туляремии в Ставропольском крае имеет сложную биоценологическую структуру и находится на территории четырех ландшафтно-географических зон: полупустынная, степная, лесостепная и предгорная. В пределах этих зон функционирует природный очаг степного типа, который отличается стойкостью, длительностью существования и способностью проявлять активность через много лет эпизоотического и эпидемического спокойствия.

Распространение мелких млекопитающих во всех ландшафтных провинциях края, их тесные связи с иксодовыми клещами, чувствительность к заражению, склонность к персистентной инфекции, а также синантропность многих видов поддерживают циркуляцию возбудителя туляремии в очаге [6].

**Целью** данной работы является оценка эпизоотологической обстановки по туляремии в Ставропольском крае за 2010–2017 гг.

### Материалы и методы

Сбор полевого материала в различных ландшафтно-географических зонах осуществляли в период с марта по ноябрь 2010–2017 гг. Данные по численности мелких млекопитающих получены путем учета на давилки «Геро». За период исследования в открытых биотопах накоплено 12400 ловушко-ночей, отловлено 596 экземпляров мелких млекопитающих, на флаг собрано и исследовано около 15 тыс.

экземпляров иксодовых клещей. Помимо этого, на наличие возбудителя туляремии исследованы зайцы и ежи, а также пробы воды и образцы сена.

Эпизоотологический мониторинг природного очага туляремии проводили в соответствии с инструктивно-методическими документами (Методические указания (МУ) 3.1.2007-05, МУ 4.2.2939-11). При исследовании иксодовых клещей и проб воды параллельно использовали биологический метод (БМ) и ПЦР. Мелких млекопитающих исследовали с помощью БМ.

Пулы иксодовых клещей и пробы воды исследовали методом ПЦР на наличие ДНК возбудителя туляремии, с использованием наборов реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Francisella tularensis* – РГФ, производство ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов). Выделение геномной ДНК проводили с использованием набора реагентов «Рибо-Преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва).

### Результаты и обсуждение

Изучение видового состава мелких млекопитающих, обитающих на территории лесостепного Ставрополя, в период с 1972 по 2010 год показало, что основу зооценоза составляют мыши рода *Sylvaemus* – 56,2 %, домовая мышь (*Mus musculus*) – 16,2 %, обыкновенная полевка (*Microtus arvalis*) – 15,3 %, малая белозубка (*Crocidura suaveolens*) – 4,8 %, серый хомячок (*Cricetulus migratorius*) – 4,3 % [6].

За время наблюдения (1972–2010 гг.) на территории лесостепной части природного очага выделено 252 штамма возбудителя туляремии, в том числе от грызунов и насекомых 183 (72,6 %), эктопаразитов – 68 (27,0 %), из объектов внешней среды – 1 (0,4 %) [6]. В пределах лесостепной части очага естественная зараженность возбудителем туляремии установлена у семи видов грызунов и одного насекомого: обыкновенная полевка (*M. arvalis*), серый хомячок (*C. migratorius*), мышь рода *Sylvaemus*, домовая мышь (*M. musculus*), полевая мышь (*Apodemus agrarius*), серая крыса (*Rattus norvegicus*), мышь-малютка (*Micromys minutus*) и малая белозубка (*C. suaveolens*) [6].

По данным наших исследований, за 2010–2017 гг. зараженность возбудителем туляремии обнаружена у следующих видов млекопитающих: малая лесная мышь (*S. uralensis*), обыкновенная полевка (*M. arvalis*), общественная полевка (*M. socialis*), домовая мышь (*M. musculus*), малая белозубка (*C. suaveolens*), южный еж (*Erinaceus roumanicus*), заяц-русак (*Lepus europaeus*).

За период проведения эпизоотического мониторинга с 2010 по 2017 год изолировано 37 штаммов возбудителя туляремии, в том числе от мелких млекопитающих – 12 (32,4 %), эктопаразитов – 9 (24,3 %)

и объектов внешней среды – 16 (43,2 %).

Доминирующим видом в обследованных районах Ставропольского края как в весенний, так и в осенний период на протяжении ряда лет остается малая лесная мышь (*S. uralensis*). Индекс доминирования составил – 39,2 %.

В зависимости от сезона субдоминант меняется: весной – домовая мышь (*M. musculus*) (15,0 %), а в осенний период – общественная (*M. socialis*) (14,1 %) и обыкновенная полевка (*M. arvalis*) (13,9 %). Индекс доминирования степной мыши (*Sicista witherbyi*) – 8,6 %, полевой мыши (*Apodemus agrarius*) – 3,0 %, серого хомячка (*C. migratorius*) – 2,4 %.

Насекомоядные в отловах представлены четырьмя видами: наибольшая попадаемость в орудия лова у малой белозубки (*C. suaveolens*) – 4,5 %. Кавказская бурозубка (*Sorex satunini*) присутствовала в отловах в 2015–2016 гг. (Красногвардейский и Труновский районы).

Единичный экземпляр белобрюхой белозубки (*C. leucodon*) пойман в степной зоне края в 2014 г. (Петровский район). В 2016 г. данный вид попадался в степной и лесостепной зоне (Красногвардейский, Труновский, Новоалександровский и Шпаковский районы) по одному экземпляру.

Бурозубка Волнухина (*S. volnuchini*) присутствовала по одному экземпляру в отловах в 2011 и 2016 гг., индекс доминирования данного вида составил 0,23 %, при относительной численности 0,01 % попадания (Красногвардейский и Труновский районы). В другие годы данный вид в орудия лова не попадался.

Весной 2010 г. численность мелких млекопитающих находилась на низком уровне – 1,7 %. В этом же году при исследовании 893 экземпляров иксодовых клещей получен один штамм от клеща *Dermacentor marginatus* в Грачевском районе, процент положительных проб составил – 0,9.

В 2011 г. осенью численность мелких млекопитающих возросла и составила 5,6 %. В Изобильненском и Предгорном районах от иксодовых клещей *Dermacentor marginatus* и *Dermacentor reticulatus* выделены штаммы, процент положительных проб составил 1,4.

В 2012 г. общая численность мелких млекопитающих за осенний период увеличилась и составила 7,3 % попадания. В Грачевском и Андроповском районах от иксодовых клещей *D. marginatus* выделены штаммы. Процент положительных на туляремию проб составил 1,7. Положительных результатов у мелких млекопитающих не выявлено.

Осенью 2013 г. численность мелких млекопитающих составила 3,8 % попадания. В Петровском районе от трупа обыкновенной полевки выделен один штамм возбудителя туляремии. Кроме того, по одной культуре выделено от иксодовых клещей *Rhipicephalus rossicus* в Изобильненском и *Hyalomma marginatum* в Туркменском районах, процент положительных проб составил 0,3.

В 2014 г. численность мелких млекопитающих незначительно возросла и составила 7,7 %. Эпизоотия туляремии не регистрировалась.

В 2015 г. численность мелких млекопитающих составила 8,0 % попадания, зарегистрирована эпизоотия среди мелких млекопитающих, возбудитель туляремии выделен из одной малой лесной мыши (*S. uralensis*) и клеща (*D. marginatus*) в Шпаковском районе (процент положительных проб составил 1,3). В Апанасенковском районе биологическим методом выделен один штамм от зайца-русака (*L. europaeus*) и один – от южного ежа (*E. roumanicus*) в Курском районе.

В 2016 г. осенью численность мелких млекопитающих достигла пикового значения по сравнению с предыдущими годами – 13,2 % попадания. В этом году выявлен один штамм от клещей (*D. reticulatus*) в Шпаковском районе (процент положительных проб возбудителем туляремии составил 0,7). В Петровском районе одна культура выделена от малой лесной мыши (*S. uralensis*).

В 2017 г. осенняя численность мелких млекопитающих составила 5,6 % попадания, выделены семь штаммов возбудителя туляремии. Из них в Шпаковском от зайца-русака (*L. europaeus*) – 1, Ипатовском от общественной полевки (*M. socialis*) – 1, Курском от домовой мыши (*M. musculus*) – 1, Петровском районе от общественной полевки (*M. socialis*) – 2 и белозубки малой (*C. suaveolens*) – 2. Кроме того, изолированы 15 штаммов туляреминого микроба из проб питьевой и технической воды, один штамм выделен из сена в Петровском районе. Методом ПЦР от иксодовых клещей семи видов (*D. reticulatus*, *D. marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *H. inermis*, *Ixodes ricinus*, *H. marginatum*, *H. scutense*), собранных весной, показано наличие возбудителя туляремии в 82 пулах, процент положительных проб составил – 0,9.

Таким образом, результаты проведенного эпизоотологического мониторинга за период 2010–2017 гг. указывают на непрерывную эпизоотию. Высокая численность мышевидных грызунов наблюдалась осенью 2016 г.: показатель превысил среднемноголетние значения (12,3 %) и составил 13,2 %. Активность природного очага подтверждена выделением штаммов от иксодовых клещей, мелких млекопитающих и объектов внешней среды.

Эпизоотическую активность очага в 1959–1970 гг. определяли многочисленные виды: *M. arvalis*, мыши рода *Sylvaemus*, *Mus musculus*. В 1972–2010 гг. в структуре основных носителей произошли изменения и ведущая роль принадлежала мышам рода *Sylvaemus*, *C. suaveolens* [4]. В настоящее время распространенным и стабильным по численности носителем являются мыши рода *Sylvaemus*.

Представленные результаты исследования указывают на постоянную эпизоотическую угрозу природного очага туляремии на территории Ставропольского края и необходимость усиления

эпидемиологического надзора за этой особо опасной инфекцией.

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

### Список литературы

1. Попов П.Н., Ртищева Л.В., Дегтярева Л.В., Левченко Б.И., Тихенко Н.И., Остапович В.В. Эпизоотическая активность природного очага туляремии в Ставропольском крае. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2011; 4:44–7.
2. Попова А.Ю., Мefодьев В.В., Степанова Т.Ф., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Марченко А.Н. Эпидемиология и профилактика туляремии на эндемичных территориях России. Ижевск: ООО «Принт-2»; 2016. 316 с.
3. Василенко Н.Ф., Ермаков А.В., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Эпизоотологический мониторинг природно-очаговых трансмиссивных инфекций в регионе Кавказских Минеральных Вод Ставропольского края. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014; 5:28–30 с.
4. Мешчерякова И.С., Михайлова Т.В., Демидова Т.Н., Кормилицына М.И. Эпизоотическая и эпидемическая активность природных очагов туляремии различных ландшафтно-эпидемиологических типов в период 2009–2014 гг. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2016; 1:42–6.
5. Зайцев А.А., Гнусарева О.А., Агапитов Д.А., Остапович В.В., Котенев Е.С. Эпидемические типы заболевания людей туляремией на территории Ставропольского края в период эпидемических проявлений различной интенсивности 2003–2017 гг. В кн.: *Здоровье населения и среда обитания*. Ставрополь: «Параграф»; 2018. С. 153–8.
6. Левченко Б.И., Дегтярева Л.В., Зайцев А.А., Григорьев М.П., Остапович В.В. Роль отдельных видов млекопитающих в поддержании природной очаговости на территории лесостепной части природного очага туляремии Ставропольского края. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; 3:30–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-3-30-33.

### References

1. Popov P.N., Rtishcheva L.V., Degtyareva L.V., Levchenko B.I., Tikhenko N.I., Ostapovich V.V. [Epizootic activity of natu-

ral tularemia focus in the Stavropol Territory]. *Meditsinsky Vestnik Severnogo Kavkaza [Medical Bulletin of North Caucasus]*. 2011; 4:44–7.

2. Popova A.Yu., Mefod'ev V.V., Stepanova T.F., Ezhlova E.B., Demina Yu. V., Marchenko A.N. [Epidemiology and Prophylaxis of Tularemia in Endemic Territories of Russia]. Izhevsk: "Print-2" Ltd; 2016. 316 p.

3. Vasilenko N.F., Ermakov A.V., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. [Epizootiological Monitoring of Natural Focal Transmissible Infections in Caucasian Mineral Waters of Stavropol Region]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2014; 5:28–30.

4. Meshcheryakova I.S., Mikhailova T.V., Demidova T.N., Kormilitsyna M.I. [Epizootic and epidemic activity of natural tularemia foci of various landscape-epidemiological types over the period of 2009–2014]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2016. 1:42–6.

5. Zaitsev A.A., Gnusareva O.A., Agapitov D.A., Ostapovich V.V., Kotenev E.S. [Epidemic types of human infection with tularemia in the Stavropol Territory during epidemic manifestations of varying intensity between 2003 and 2017]. In: [Public Health and Life Environment]. Stavropol: "Paragraph"; 2018. P. 153–8.

6. Levchenko B.I., Degtyareva L.V., Zaitsev A.A., Grigor'ev M.P., Ostapovich V.V. [The role of certain species of small mammals in the persistence of natural focality in the territory of forest-steppe zone of the natural tularemia focus of the Stavropol Region]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2014; 3:30–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-3-30-33.

### Authors:

Gerasimenko E.V., Tsapko N.V., Gnusareva O.A., Shkarlet G.P., Belova O.A. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

### Об авторах:

Герасименко Е.В., Цапко Н.В., Гнусарева О.А., Шкарлет Г.П., Белова О.А. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Поступила 17.10.18.

Отправлена на доработку 30.11.18.

Принята к публ. 29.12.18.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-113-116

УДК 616.932:615.371

О.С. Дуракова, О.В. Громова, А.В. Гаева, С.В. Генералов, Л.Ф. Ливанова, О.Д. Клокова, О.А. Волох

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК CHO-K1 ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМПОНЕНТОВ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

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

**Цель** – экспериментально обосновать возможность использования перевиваемой линии клеток CHO-K1 для определения специфической активности холерного токсина и компонента вакцины холерогена-анатоксина в процессе производства холерной химической вакцины. **Материалы и методы.** В исследованиях использовали перевиваемую линию клеток CHO-K. Учет результатов метода биоиндикации на перевиваемой клеточной линии проводили визуально с помощью инвертированного микроскопа и фотометрически в колориметрическом тесте для оценки метаболической активности клеток при длине волны 595 нм. **Результаты и обсуждение.** Предлагаемый метод позволяет определить активность продукции токсина у штамма *Vibrio cholerae* 569B при глубинном культивировании в биореакторе и специфическую активность холерогена-анатоксина по анатоксиносвязыванию с использованием клеточных культур. Результаты коррелируют с данными, полученными при использовании методов внутрикожной пробы по Крейгу, GM<sub>1</sub>-ИФА и РПИГ. Введение в практику метода клеточных культур может обеспечить существенное сокращение использования животных на этапах производства вакцины холерной бивалентной химической.

**Ключевые слова:** холерная химическая вакцина, культура клеток CHO-K1, холерный токсин, холероген-анатоксин.

*Корреспондирующий автор:* Дуракова Оксана Сергеевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

*Для цитирования:* Дуракова О.С., Громова О.В., Гаева А.В., Генералов С.В., Ливанова Л.Ф., Клокова О.Д., Волох О.А. Экспериментальное обоснование возможности использования перевиваемой линии клеток CHO-K1 для определения специфической активности компонентов холерной химической вакцины. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 4:113–116. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-113-116

O.S. Durakova, O.V. Gromova, A.V. Gaeva, S.V. Generalov, L.F. Livanova, O.D. Klokhova, O.A. Volokh

### Experimental Substantiation of the Possibility to Use Finite Cell Line CHO-K1 for Determination of Specific Activity of Components of Chemical Cholera Vaccine

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

**Abstract. Objective** was to experimentally substantiate the possibility to use the finite cell line CHO-K1 for measuring specific activity of cholera toxin and component of the vaccine cholera-anatoxin in the process of chemical cholera vaccine manufacturing. **Materials and methods.** The studies involved the finite cell line CHO-K. The registration of results of bio-indication method was performed visually with the help of inverted microscope and photometrically – in colorimetric test for the assessment of metabolic activity of the cells at the wave length of 595 nm. **Results and discussion.** The proposed method allows for determining the toxin-production activity of *Vibrio cholerae* 569B strain during submerged cultivation in bioreactor and specific activity of cholera-anatoxin by anatoxin binding measuring using cell cultures. The results correlate with the data obtained using intra-dermal Craig's technique, GM<sub>1</sub>-ELISA and radial passive immune hemolysis (RPIH). Introduction of cell culture method into practice will provide for significant decrease in the volumes of usage of animals at the stages of manufacturing of chemical bivalent cholera vaccine.

**Key words:** chemical cholera vaccine, cell culture CHO-K1, cholera toxin, cholera-anatoxin.

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

*Corresponding author:* Oksana S. Durakova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

*Citation:* Durakova O.S., Gromova O.V., Gaeva A.V., Generalov S.V., Livanova L.F., Klokhova O.D., Volokh O.A. Experimental Substantiation of the Possibility to Use Finite Cell Line CHO-K1 for Determination of Specific Activity of Components of Chemical Cholera Vaccine. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:113–116. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-113-116

*Received* 09.08.19. *Revised* 13.11.19. *Accepted* 27.11.19.

Холерная химическая вакцина, разработанная в РосНИПЧИ «Микроб» и зарегистрированная на территории России, состоит из холерогена-анатоксина и О-антигенов холерного вибриона сероваров Инаба и Огава. Актуальным вопросом производства вакцин остается совершенствование методов контроля активных компонентов.

В настоящее время для контроля специфической активности на этапах производства холерной вакци-

ны используют лабораторных животных [1]. В то же время в литературных источниках приводятся результаты исследований, свидетельствующие о возможности применения альтернативных методов, основанных на использовании перевиваемых клеточных культур для оценки активности холерного токсина. Данные методы высокочувствительны и воспроизводимы, так как в работе используются стандартные среды и референтные линии клеток. Установлено,

что по чувствительности эти тесты сопоставимы с разрешающей способностью биопробы [2].

В связи с вышеизложенным замена методов определения специфической активности компонентов холерной химической вакцины на биомоделях на этапах ее производства на высокочувствительные, воспроизводимые и простые в постановке методы *in vitro* является актуальной задачей и определяет необходимость их внедрения в производственный процесс.

**Цель работы** – экспериментальное обоснование возможности использования перевиваемой линии клеток СНО-К1 для определения специфической активности холерного токсина и компонента вакцины холерогена-анатоксина в процессе производства холерной химической вакцины.

### Материалы и методы

В работе использованы образцы фильтрата бульонной культуры *V. cholerae* 569В, компоненты вакцины (холероген-анатоксины), и, в качестве положительного контроля, препарат холерного токсина (ХТ). Подготовку образцов культуральной жидкости, содержащих ХТ, проводили согласно СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

В качестве биомodelей использовали клинические здоровых взрослых кроликов породы шиншилла со светлой кожей и массой (2,75±0,25) кг. Все работы с животными проводили в соответствии с протоколом исследования, утвержденным биоэтической комиссией института «Микроб», в условиях вивария ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» с уровнем биологической безопасности BSL 3.

Концентрацию белка в исследуемых образцах определяли по Лоури. Концентрация белка в препарате ХТ составила 30 мкг/лунку, а в препаратах холерогена-анатоксина 57 мкг/лунку.

Перевиваемая линия клеток СНО-К1 получена из Коллекции культур клеток позвоночных ИИЦ РАН (Санкт-Петербург). Клетки культуры СНО-К1 выращивали в среде Игла и 199 (1:1) с добавлением 5 % сыворотки КРС по общепринятой методике с соблюдением условий асептики. Планшеты инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С с содержанием 5 % CO<sub>2</sub>. Через 18–20 ч заменяли питательную среду по 100 мкл без сыворотки.

Определение активности ХТ на линии клеток СНО-К1 проводили по следующей схеме: в первые лунки каждого ряда вносили исследуемые образцы фильтрата бульонной культуры, разведенные 1:10 в питательной среде, по 100 мкл; далее образцы титровали до конца ряда по 100 мкл, получая двукратные разведения с конечным объемом 100 мкл.

Для подтверждения специфичности действия образца на клеточную культуру ставили контроль специфичности, для этого исследуемый образец добавляли к антихолерогенной сыворотке с ранее

установленным титром в соотношении 1:1; смесь инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Планшет закрывали и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Через 18 ч проводили морфологическое изучение культур с помощью инвертированного микроскопа «Биомед 3».

Учет реакции с опытными образцами осуществляли в системе контролей: контроль клеток в среде культивирования (отрицательный контроль), контроль активности стандартного препарата ХТ (положительный контроль), контроль нейтрализации действия контрольного препарата (контроль специфичности). Активность ХТ оценивали путем подсчета процента содержания измененных и типичных клеток в лунке. Произвольно выбирали три поля зрения по 100 клеток. За токсическую концентрацию принимали ту концентрацию токсина, которая вызывает специфические изменения у 50 % наблюдаемых клеток: удлинение, деформация, появление разветвленных отростков. Активность ХТ выражают либо в мкг/лунка, либо в титрах.

Активность ХТ штамма *V. cholerae* 569В определяли также биологическим методом – внутрикожной пробой по Крейгу [3] на кроликах и иммунохимическими методами: иммуноферментным анализом с использованием GM<sub>1</sub>-ганглиозидов (GM<sub>1</sub>-ИФА) и радиальным пассивным иммунным гемолизом (РПИГ). Постановку GM<sub>1</sub>-ИФА и РПИГ проводили по стандартным методикам [4, 5]. В работе использовали GM<sub>1</sub>-ганглиозиды (Sigma), в качестве субстрата ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). Результаты реакции регистрировали на фотометре iMark (Bio-Rad, США) при длине волны 405 нм.

Подготовку образцов холерогена-анатоксина для определения специфической активности по ЕС проводили по стандартной методике [6]. В качестве антитоксического агента использовали антихолерогенную сыворотку. Исследуемые образцы после пробоподготовки вводили внутрикожно одновременно двум кроликам по 0,1 мл каждого разведения, начиная с 2 АЕ. Те же образцы вносили в лунки культурального планшета по 0,1 мл на сформированный монослой. На кроликах и культуре клеток учет проводили через 24 ч. За положительную реакцию в опытных рядах на животных принимали зону отека от 5 до 10 мм, а на культуре клеток за токсическую концентрацию принимали то количество токсина, которое вызывает специфические изменения у 50 % наблюдаемых клеток.

Для учета результатов также применяли колориметрический тест оценки метаболической активности клеток (МТТ), основанный на способности мембранных дегидрогеназ восстанавливать тетразолиевый краситель (ТК) (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) до синего формазана. После 24 ч инкубации клеток с исследуемыми образцами во все лунки 96-луночного планшета добавляли по 10 мкл ТК в забуференном физиоло-

гическом растворе (5 мг/мл) и дополнительно инкубировали в течение 4 ч при температуре 37 °С, затем содержимое лунок растворяли добавлением 100 мкл ДМСО (диметилсульфоксида). Оптическую плотность полученного лизата измеряли при длине волны 595 нм на фотометре iMark. Повреждающий эффект (%) рассчитывали по формуле  $(OD_{595ab}/OD_{595kontrol}) \cdot 100$  [7].

Статистическую обработку результатов проводили, рассчитывая среднее арифметическое значение ( $M$ ), среднее квадратичное отклонение ( $s_x$ ) и стандартную ошибку среднего ( $m_M$ ). Коэффициент корреляции рассчитывали по Пирсону [8].

### Результаты и обсуждение

Перевиваемая линия клеток СНО-К1, согласно литературным данным, является наиболее чувствительной линией в отношении ХТ и позволяет выявлять до 20–30 пг/мл вещества [9, 10]. ИФА с использованием  $GM_1$ -ганглиозидов является наиболее чувствительным иммуноферментным методом детекции ХТ, так как обладает сродством к его иммуногенной В-субъединице [5]. В связи с этим данная линия клеток и вариант  $GM_1$ -ИФА использовались нами для определения специфической активности ХТ на этапах производства активного компонента вакцины – холерогена-анатоксина, который получают путем осаждения из безмикробного центрифугата формализированной бульонной культуры штамма *V. cholerae* 569В. В результате формоловой детоксикации ХТ переходит в холероген-анатоксин. Содержание ХТ в бульонной культуре производственного штамма является показателем качества препарата, по которому оценивают возможность дальнейшего проведения производственного цикла.

Контроль содержания ХТ на этапе получения бульонной культуры проводили на культуре клеток СНО-К1 и методом  $GM_1$ -ИФА, а также, согласно нормативной документации, постановкой внутрикожной пробы по Крейгу и в РПИГ. Исследовано 12 образцов фильтратов бульонной культуры. В среднем значения реципрокных титров по всем трем методам составили, соответственно, по Крейгу (128000±395), в РПИГ – (128±11), ИФА – (160±22), на модели культуры клеток – (1280±101). Минимальные значения в реакции по методу Крейга – (2000±51), РПИГ – (8±2), ИФА – (8±2), модели клеточной линии – (160±11). Результаты определения активности ХТ штамма *V. cholerae* 569В с помощью культуры клеток имели положительную корреляцию с данными о токсигенности, полученными при использовании методов внутрикожной пробы по Крейгу, РПИГ и ИФА, при оценке результатов исследования ХТ этими методами коэффициенты корреляции по Пирсону составили 0,8, 0,7, 0,8 соответственно.

Учет результатов метода биоиндикации на перевиваемой клеточной линии проводили также в тесте МТТ. Установлено, что количество живых клеток в

лунках планшета оказалось обратно пропорционально содержанию ХТ в них. В частности, при концентрации белка 15 мкг отмечалось (13±1) % живых клеток, а при 3,75 мкг их количество возрастало до (82±1) %, что соответствовало данным, полученным при визуальном учете морфологических изменений с помощью инвертированного микроскопа.

Предлагаемый метод перевиваемой линии клеток позволяет без использования животных определять присутствие ХТ и уровень его специфической активности в фильтратах бульонной культуры при производстве вакцины холерной бивалентной химической.

Следующим этапом работы являлось определение специфической активности холерогена-анатоксина на культуре клеток параллельно со стандартным методом постановки реакции нейтрализации на животных. Классический метод реакции нейтрализации ХТ, проводимый на животных, является трудоемким, сложным в постановке и дорогостоящим.

При анализе полученных результатов выявлено, что значения показателей специфической активности сопоставимы: в среднем обратные титры составили (5000±302) для реакции нейтрализации на кроликах и (6000±605) для метода биоиндикации. Результаты определения антигенной активности специфической фракции холерогена-анатоксина с помощью реакции анатоксиносвязывания на культуре клеток СНО-К1 имели положительную корреляцию с данными, полученными при использовании регламентного метода нейтрализации, коэффициент корреляции Пирсона составил 0,8.

Введение в практику метода клеточных культур может обеспечить существенное сокращение использования животных при решении вопросов, касающихся количественной оценки биологической активности компонентов холерной вакцины.

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

### Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербакова С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 1:89–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-1-89-101.
2. Гаева А.В., Громова О.В., Дуракова О.С., Генералов С.В., Волох О.А. Современные подходы к контролю активных компонентов холерной химической вакцины. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018; 1:152–7.
3. Craig J. Preparation of the vascular permeability factor of *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(3):793–5. PMID: 5922548. PMID: PMC276327.
4. Шагинян И.А., Маракуша Б.М. Модификация метода пассивного иммунного гемолиза на плотной среде для выявления продукции термоллабильных энтеротоксинов штаммами холерных вибрионов и кишечной палочки. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1983; 2:92–6.
5. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine*. 2019; pii: S0264-410X(19)31020-5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII издание. Москва; 2015. Т. 1–3.
7. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of Cell Viability

by the MTT Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018; 6. DOI: 10.1101/pdb.prot095505.

8. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высш. шк.; 1990. 352 с.

9. Guerrant R.L., Brunton L.L., Schaitman T.C., Rebhun L.I., Cilman A.C. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1974; 10(2):320–7. PMID: 4368545. PMCID: PMC414999.

10. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. М: Бином. Лаб. Знаний; 2010. 714 с.

## References

1. Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Kuttyrev V.V., Smirnova N.I., Shcherbakova S.A., Moskvitina E.A., Titova S.V. [Relevant issues of epidemiological surveillance, laboratory diagnosis and prophylaxis of cholera in the Russian Federation]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology]. 2016; 1:89–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-1-89-101.

2. Gaeva A.V., Gromova O.V., Durakova O.S., Generalov S.V., Volokh O.A. [Modern approaches to the control of active agents of chemical cholera vaccine]. *Razrabotka i Registratsiya Lekarstvennykh Sredstv* [Development and Registration of Pharmaceuticals]. 2018; 1:152–7.

3. Craig J. Preparation of the vascular permeability factor of *V. cholera*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(3):793–5. PMID: 5922548. PMCID: PMC276327.

4. Shaginyan I.A., Marakusha B.M. [Modification of the method of passive immune hemolysis on solid nutrient medium for measuring the production of thermo labile enterotoxins by the strains of cholera vibrios and colibacillus]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology]. 1983; 2:92–6.

5. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay

A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine.* 2019; pii: S0264-410X(19)31020-5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.

6. State Pharmacopeia of the Russian Federation, 13th edition. Moscow; 2015. Vol. 1–3.

7. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018; 6. DOI: 10.1101/pdb.prot095505.

8. Lakin G.F. [Biometry: Textbook for biology students of specialized higher educational institutions]. Moscow; 1990. 352 p.

9. Guerrant R.L., Brunton L.L., Schaitman T.C., Rebhun L.I., Cilman A.C. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1974; 10(2):320–7. PMID: 4368545. PMCID: PMC414999.

10. Freshni R.Ya. [Animal cell culture: Practice Guidelines]. Moscow; 2010. 714 p.

## Authors:

Durakova O.S., Gromova O.V., Gaeva A.V., Generalov S.V., Livanova L.F., Klokova O.D., Volokh O.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

## Об авторах:

Дуракова О.С., Громова О.В., Гаева А.В., Генералов С.В., Ливанова Л.Ф., Клокова О.Д., Волох О.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 09.08.19.

Отправлена на доработку 05.11.19.

Принята к публ. 27.11.19.

### К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ МИХАИЛА НИКОЛАЕВИЧА ШИЛОВА

22 октября 2019 г. исполнилось 100 лет со дня рождения Михаила Николаевича Шилова, старшего научного сотрудника, кандидата биологических наук, участника Великой Отечественной войны.

Михаил Николаевич Шилов проработал в институте «Микроб» более 20 лет (с 1966 по 1989 год) в лаборатории зоологии. Его научные интересы охватывали широкий круг вопросов, связанных, в первую очередь, с экологией грызунов и регуляцией их численности, эпизоотологией и природной очаговостью, различными аспектами зоогеографии, а также разработкой и апробацией приманочного метода истребления грызунов-носителей чумы. По этим темам М.Н. Шиловым самостоятельно и в соавторстве опубликовано более 200 научных работ. Он принимал активное участие в планировании и проверке эффективности истребительных работ в различных очагах чумы.



М.Н. Шилов активно работал в нескольких научных обществах (Московское общество испытателей природы, Всесоюзное териологическое общество, Энтомологическое общество при СГУ и др.). До последних дней он был активным членом президиума Кировского районного Совета ветеранов войны и труда, членом комитета содействия Кировскому РВК, членом президиума Совета ветеранов 148 стрелковой дивизии и лектором общества «Знание».

Помимо боевых наград Великой Отечественной войны (орден Красной Звезды, четыре ордена Отечественной войны), М.Н. Шилов награжден знаком «Отличник здравоохранения», медалью «Ветеран труда» и почетными грамотами.

Михаил Николаевич был обаятельным человеком и настоящим товарищем в самом высоком смысле этого слова. Память о нем мы сохраним в своих сердцах.

**ПАМЯТИ КОЛЛЕГИ**  
**Revering the Memory of the Colleague**

---

**ПАМЯТИ КОСИЛКО СЕРГЕЯ АЛЕКСАНДРОВИЧА**  
**(22.09.1959 – 13.12.2019)**



13 декабря 2019 г. после тяжелой болезни ушел из жизни Сергей Александрович Косилко, заведующий отделом эпидемиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института, кандидат медицинских наук.

Сергей Александрович – крупный специалист в области эпидемиологии особо опасных, природно-очаговых инфекционных болезней, известный ученый-чумолог, автор

более 80 научных публикаций. Вся его деятельность была направлена на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия на территории Дальнего Востока и Сибири. Он участвовал в локализации и ликвидации эпидемических проявлений опасных инфекционных болезней в этих регионах.

Сергей Александрович останется в нашей памяти как доброжелательный интересный человек, настоящий ученый и профессионал своего дела.

Редакционная коллегия и редакционный совет журнала «Проблемы особо опасных инфекций» выражают глубокое соболезнование родным и близким Сергея Александровича Косилко и сотрудникам Иркутского научно-исследовательского противочумного института.