

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Научно-практический журнал
Выходит четыре раза в год
Основан в 1968 году

Главный редактор академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор **В.В. Кутырев**

*Журнал входит в перечень ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий,
в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций
на соискание ученой степени доктора и кандидата наук
Журнал индексируется в Scopus*

Выпуск 3

2020

САРАТОВ

Подписной индекс в каталогах
«Почта России» – 24687,
«Пресса России» – 29448

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи и массовых
коммуникаций
Свидетельство ПИ № ФС77-74153
от 29 октября 2018 г.

Журнал «Проблемы особо опасных
инфекций» является рецензируемым
изданием

Все рукописи проходят проверку
системой «Антиплагиат»

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

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

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

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

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

Проблемы особо опасных инфекций
2020. Вып. 3. 158 с.

Подписано в печать 25.09.2020
Формат 60×88 1/8
Бумага мелованная
Печать офсетная
Усл. печ. л. 19,35
Гарнитура Таймс. Заказ 2699-20/161020

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

© Федеральное казенное учреждение
здравоохранения «Российский научно-
исследовательский противочумный
институт «Микроб», 2020

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)
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

2020, Issue 3

Scientific and Practical Peer-Reviewed Journal. Issued quarterly. Founded in 1968

Problems of Particularly Dangerous Infections is published by Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe"

Editor-in-Chief: *Kutyrev V.V.*, Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS

Editorial Council

Abdikarimov S.T., Doctor of Medical Science, Associate Professor (Bishkek, Kyrgyzstan)
Akimkin V.G., Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Moscow, Russia)
Balakhonov S.V., Doctor of Medical Science, Professor (Irkutsk, Russia)
Bondarev V.P., Doctor of Medical Science, Professor (Moscow, Russia)
Borisevich S.V., Doctor of Biological Science, Professor, Corresponding Member of the RAS (Sergiev Possad, Russia)
Gintsburg A.L., Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Moscow, Russia)
Dyatlov I.A., Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Obolensk, Russia)
Keita S., Ph. D., Conakry, Republic of Guinea
Kulichenko A.N., Doctor of Medical Science, Professor, Corresponding Member of the RAS (Stavropol, Russia)

Lvov D.K., Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Moscow, Russia)
Maleev V.V., Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Moscow, Russia)
Motin V.L., Ph. D., Professor (Galveston, USA)
Onishchenko G.G., Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Moscow, Russia)
Rudakov N.V., Doctor of Medical Science, Professor (Omsk, Russia)
Sergiev V.P., Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Moscow, Russia)
Skurnik M., Professor (Helsinki, Finland)
Titov L.P., Doctor of Medical Science, Professor, Corresponding Member of the NAS of Belarus, Foreign Member of the RAS (Minsk, Belarus)
Toporkov A.V., Doctor of Medical Science (Volgograd, Russia)
Tsogbadrakh Namdorj, Ph. D. (Ulaanbaatar, Mongolia)

Editorial Board

Alkhovsky S.V., Doctor of Biological Science (Moscow, Russia)
Andaev E.I., Doctor of Medical Science (Irkutsk, Russia)
Bugorkova S.A., Doctor of Medical Science (Saratov, Russia)
Victorov D.V., Doctor of Biological Science (Volgograd, Russia)
Guliy O.I., Doctor of Biological Science (Saratov, Russia)
Eroshenko G.A., Doctor of Biological Science (Saratov, Russia)
Zharnikova I.V., Doctor of Biological Science (Stavropol, Russia)
Karpunina L.V., Doctor of Biological Science, Professor (Saratov, Russia)
Kras'ko A.G., Ph. D., Associate Professor (Minsk, Belarus)
Kruglikov V.D., Doctor of Medical Science (Rostov-on-Don, Russia)
Magassouba N., Ph. D., Conakry, Republic of Guinea
Maletskaya O.V., Doctor of Medical Science, Professor (Stavropol, Russia)

Meka-Mechenko T.V., Doctor of Medical Science (Almaty, Kazakhstan)
Mikero A.N., Doctor of Biological Science (Saratov, Russia)
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

Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Слудский А.А., Ибрагимов Э.Ш., Абдикаримов С.Т., Мека-Меченко В.Г., Бердибеков А.Т., Никитин А.Я., Корзун В.М., Попов Н.В. Место дезинсекции и дератизации в системе неспецифической профилактики заболеваний населения в природных очагах чумы на территории стран СНГ 6

Монахова Е.В., Ghosh A., Mutreja A., Weill F.-X., Ramamurthy T. Эндемичная холера в Индии и завозная холера в России: что общего? 17

Оригинальные статьи

Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семененко Т.А., Плоскирева А.А., Дубоделов Д.В., Тиванова Е.В., Пшеничная Н.Ю., Каленская А.В., Яцышина С.Б., Шипулина О.Ю., Родионова Е.Н., Петрова Н.С., Соловьева И.В., Квасова О.А., Вершинина М.А., Мамошина М.В., Клущкина В.В., Чурилова Н.С., Панасюк Я.В., Власенко Н.В., Остроушко А.А., Балмасов Е.С., Мосунов А.В. Гендерно-возрастная характеристика пациентов с COVID-19 на разных этапах эпидемии в Москве 27

Блох А.И., Пеневская Н.А., Рудаков Н.В., Лазарев И.И., Михайлова О.А., Федоров А.С., Пневский Ю.А. Эпидемический потенциал COVID-19 в Омской области на фоне противоэпидемических мероприятий 36

Бондаренко А.П., Шмыленко В.А., Троценко О.Е., Котова В.О., Бутакова Л.В., Базыкина Е.А. Характеристика бактериальной микрофлоры, выделенной из проб мокроты больных пневмонией в Хабаровске и Хабаровском крае в начальный период пандемии COVID-19 (май–июнь 2020 г.) 43

Волох О.А., Борисова С.В., Бибики Д.Н., Кузнецова Е.М., Самохвалова Ю.И., Авдеева Н.Г., Комиссаров А.В., Никифоров А.К. Электрооптический анализ жизнеспособности клеток вакцинного штамма туляремийного микроба ... 50

Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Альхова Ж.В., Балыкова А.Н., Попов Н.В., Краснов Я.М., Червякова Н.С., Кутырев В.В. Филогенетическая история Каракумского пустынного очага 56

Карцева А.С., Калмантаева О.В., Силкина М.В., Комбарова Т.И., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Фирстова В.В. Характеристика иммуногенных и протективных свойств модифицированных вариантов штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ 62

Краснов Я.М., Попова А.Ю., Сафронов В.А., Федоров А.В., Баданин Д.В., Щербак С.А., Кутырев В.В. Анализ геномного разнообразия SARS-CoV-2 и эпидемиологических признаков адаптации возбудителя COVID-19 к человеческой популяции (Сообщение 1) 70

Курчева С.А., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Сирица Ю.В., Костюченко М.В., Кошкидько А.Г., Жарникова И.В., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Жилов А.М. Качественные показатели экспериментальных бруцеллезных антигенных препаратов, предназначенных для клеточных тестов *in vitro* 83

Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б. Фено- и генотипические особенности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов различного происхождения, изолированных на территории России 89

Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Boumbaly S., Balde T.A.L., Семенов А.В. Первичные мутации лекарственной устойчивости вируса гепатита С у пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией 97

Reviews

Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Sludsky A.A., Ibragimov E.Sh., Abdikarimov S.T., Meka-Mechenko V.G., Berdibekov A.T., Nikitin A.Ya., Korzun V.M., Popov N.V. The Role of Disinsection and Deratization in the Framework of Non-Specific Prophylaxis of Diseases among the Population in Natural Plague Foci in the Territory of the CIS Countries

Monakhova E.V., Ghosh A., Mutreja A., Weill F.-X., Ramamurthy T. Endemic Cholera in India and Imported Cholera in Russia: What is Common?

Original articles

Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenenko T.A., Ploskireva A.A., Dubodelov D.V., Tivanova E.V., Pshenichnaya N.Yu., Kalenskaya A.V., Yatsyshina S.B., Shipulina O.Yu., Rodionova E.N., Petrova N.S., Solov'eva I.V., Kvasova O.A., Vershinina M.A., Mamoshina M.V., Klushkina V.V., Churilova N.S., Panasyuk Ya.V., Vlasenko N.V., Ostroushko A.A., Balmasov E.S., Mosunov A.V. Gender-Age Distribution of Patients with COVID-19 at Different Stages of Epidemic in Moscow

Blokh A.I., Pen'evskaya N.A., Rudakov N.V., Lazarev I.I., Mikhailova O.A., Fedorov A.S., Pnevsky Y.A. Epidemic Potential of COVID-19 in Omsk Region during Anti-Epidemic Measures

Bondarenko A.P., Shmylenko V.A., Trotsenko O.E., Kotova V.O., Butakova L.V., Bazykina E.A. Characteristics of Bacterial Microflora Isolated from Sputum of Patients with Pneumonia Registered in Khabarovsk City and Khabarovsk Territory in the Initial Period of COVID-19 Pandemic in May–June, 2020

Volokh O.A., Borisova S.V., Bibikov D.N., Kuznetsova E.M., Samokhvalova Yu.I., Avdeeva N.G., Komissarov A.V., Nikiforov A.K. Electro-Optical Analysis of Cell Viability of Tularemia Microbe Vaccine Strain

Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Al'khova Zh.V., Balykova A.N., Popov N.V., Krasnov Ya.M., Chervyakova N.S., Kutyrev V.V. Phylogenetic History of Kara Kum Desert Focus

Kartseva A.S., Kalmantaeva O.V., Silkina M.V., Kombarova T.I., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Firstova V.V. Characterization of Immunogenic and Protective Properties of the Modified Variants of the Strain *Francisella tularensis* 15 NIEG

Krasnov Ya.M., Popova A.Yu., Safronov V.A., Fedorov A.V., Badanin D.V., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Genomic Diversity Analysis of SARS-CoV-2 and Epidemiological Features of Adaptation of COVID-19 Agent to Human Population (Communication 1)

Kurcheva S.A., Kovalev D.A., Ponomarenko D.G., Siritsa Yu.V., Kostyuchenko M.V., Koshkid'ko A.G., Zharnikova I.V., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Zhirov A.M. Qualitative Indicators of Experimental Brucellosis Antigen Preparations Designed for Cellular Tests *in vitro*

Levchenko D.A., Kругликов V.D., Gaevskaya N.E., Vodop'yanov A.S., Nepomnyashchaya N.B. Pheno- and Genotypical Features of Non-Toxicogenic Strains of Cholera Vibrios of Different Origins, Isolated in the Territory of Russia

Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Zueva E.B., Serikova E.N., Shchemelev A.N., Boumbaly S., Balde T.A.L., Semenov A.V. Primary HCV Drug Resistance Mutations in Patients with Newly Diagnosed HIV Infection

- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Балахонов С.В., Чеснокова М.В., Дубровина В.И., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Трухина А.Г., Пережогин А.Н., Пятидесятникова А.Б., Брюхова Д.Д., Киселева Н.О., Gefan N.G., Gavrilo O.V., Gavrilo T.A., Lomonosova V.I., Totolyan A.A. Опыт исследования серопревалентности к вирусу SARS-CoV-2 населения Иркутской области в период вспышки COVID-19 106
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Историк О.А., Мосевич О.С., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Черный М.А., Балабышева Н.С., Логинова И.С., Владимирова О.С., Самоглядова И.С., Васев Н.А., Румянцева С.В., Чупалова Е.Ю., Селиванова Г.В., Муравьева М.В., Тимофеева Л.В., Ханкишиева Э.Н., Тылчевская В.Д., Никитенко Н.Д., Костеницкая Т.И., Виркунен Н.В., Климкина И.М., Кузьмина Т.М., Дегтяренко Н.В., Баунова А.И., Филиппова Л.А., Пальчикова Н.А., Кулшкин А.В., Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Богумильчик Е.А., Воскресенская Е.А., Дробышевская В.Г., Зуева Е.В., Кокорина Г.И., Курова Н.Н., Любимова Н.Е., Ферман Р.С., Хамдулаева Г.Н., Хамитова И.В., Хорькова Е.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тотолян А.А. Оценка популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Ленинградской области в период эпидемии COVID-19 114
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Фридман Р.К., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Чхинджерия И.Г., Гречанинова Т.А., Агапов К.А., Арсентьева Н.А., Баженова Н.А., Бацунов О.К., Данилова Е.М., Зуева Е.В., Комкова Д.В., Кузнецова Р.Н., Любимова Н.Е., Маркова А.Н., Хамитова И.В., Ломоносова В.И., Ветров В.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тотолян А.А. Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период эпидемии COVID-19 124
- Рудакова С.А., Пеневская Н.А., Блох А.И., Савельев Д.А., Теслова О.Е., Канешова Н.Е., Рудаков Н.В., Транквиловский Д.В. Эпидемиологическая ситуация по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2019 г. в сравнении с периодом 2002–2018 гг. 131
- Сазанова Е.В., Малиюкова Т.А., Попов Ю.А., Ляпин М.Н. Разработка методических подходов и критериев для отнесения учебных штаммов *Yersinia pestis* к III группе патогенности (опасности) 139
- Краткие сообщения**
- Бакштановская И.В., Степанова Т.Ф., Шарухо Г.В., Летюшев А.Н., Степанова К.Б., Логинова Н.В., Панина Ц.А., Зматракова Е.А., Косырева А.Н., Бартусевич А.З., Леонтьева С.А., Вишнякова А.О. Результаты выявления SARS-CoV-2 и других возбудителей внебольничных пневмоний методом ПЦР в Тюменской области 146
- Заднова С.П., Баданин Д.В., Плеханов Н.А., Полунина Т.А., Котова Н.В., Крицкий А.А., Федоров А.В., Краснов Я.М. Сравнительные протеомные профили типичного штамма и генетически измененного варианта *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор 150
- Попова Р.В., Руженцова Т.А., Хавкина Д.А., Чухляев П.В., Гарбузов А.А., Мешкова Н.А. Нарушения функции желудочно-кишечного тракта при COVID-19 у детей 154
- Юбилей**
- К 65-летию со дня рождения Александра Николаевича Куличенко 158
- Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Balakhonov S.V., Chesnokova M.V., Dubrovina V.I., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Trukhina A.G., Perezhogin A.N., Pyatidesyatnikova A.B., Bryukhova D.D., Kiseleva N.O., Gefan N.G., Gavrilo O.V., Gavrilo T.A., Lomonosova V.I., Totolyan A.A. Experience in Studying Seroprevalence to SARS-CoV-2 Virus in the Population of the Irkutsk Region during COVID-19 Outbreak 106
- Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Historik O.A., Mosevich O.S., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Cherny M.A., Balabysheva N.S., Loginova I.S., Vladimirova O.S., Samoglyadova I.S., Vasev N.A., Rumyantseva S.V., Chupalova E.Yu., Selivanova G.V., Muraviova M.V., Timofeeva L.V., Khankishieva E.N., Tylchevskaya V.D., Nikitenko N.D., Kostenitskaya T.I., Virkunen N.V., Klimkina I.M., Kuzmina T.M., Degtyarenko N.V., Bazunova A.I., Filippova L.A., Palchikova N.A., Kukshkin A.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Bogumilchik E.A., Voskresenskaya E.A., Drobyshevskaya V.G., Zueva E.V., Kokorina G.I., Kurova N.N., Lyubimova N.E., Ferman R.S., Khamdulaeva G.N., Khamitova I.V., Khorkova E.V., Milichkina A.M., Dedkov V.G., Totolian A.A. Assessment of the Herd Immunity to SARS-CoV-2 among the Population of the Leningrad Region during the COVID-19 Epidemic 114
- Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Bashketova N.S., Fridman R.K., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Chkhindzheriya I.G., Grechaninova T.A., Agapov K.A., Arsent'eva N.A., Bazhenova N.A., Batsunov O.K., Danilova E.M., Zueva E.V., Komkova D.V., Kuznetsova R.N., Lyubimova N.E., Markova A.N., Khamitova I.V., Lomonosova V.I., Vetrov V.V., Milichkina A.M., Dedkov V.G., Totolyan A.A. Herd Immunity to SARS-CoV-2 among the Population in Saint-Petersburg during the COVID-19 Epidemic 124
- Rudakova S.A., Pen'evskaya N.A., Blokh A.I., Savel'ev D.A., Teslova O.E., Kaneshova N.E., Rudakov N.V., Trankvilevsky D.V. Epidemiological Situation on Tick-Borne Borreliosis in the Russian Federation in 2019 Compared to the Period of 2002–2018 131
- Sazanova E.V., Malyukova T.A., Popova Yu.A., Lyapin M.N. Development of Methodological Approaches and Criteria to Classify *Yersinia pestis* Training Strains as an Agent of Pathogenicity (Hazard) Group III 139
- Brief communications**
- Bakshtanovskaya I.V., Stepanova T.F., Sharukho G.V., Letyushev A.N., Stepanova K.B., Loginova N.V., Panina Ts.A., Zmatrakova E.A., Kosyрева A.N., Bartusevich A.Z., Leont'eva S.A., Vishnyakova A.O. Results of Detecting SARS-CoV-2 and Other Pathogens of Community-Acquired Pneumonia by PCR in the Tyumen Region 146
- Zadnova S.P., Badanin D.V., Plekhanov N.A., Polunina T.A., Kotova N.V., Kritsky A.A., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M. Comparative Proteomic Profiles of Typical Strain and Genetically Altered Variant of *Vibrio cholerae* O1, Biovar El Tor 150
- Popova R.V., Ruzhentsova T.A., Khavkina D.A., Chukhlyaev P.V., Garbuzov A.A., Meshkova N.A. Gastrointestinal Tract Disorders in COVID-19 Infected Children 154
- Anniversary**
- To the 65-th Anniversary of Alexander N. Kilichenko 158

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-6-16

УДК 616.98:579.841.95(45+57)СНГ

А.Н. Матросов¹, А.А. Кузнецов¹, А.А. Слудский¹, Э.Ш. Ибрагимов², С.Т. Абдикаримов²,
В.Г. Мека-Меченко³, А.Т. Бердибеков³, А.Я. Никитин⁴, В.М. Корзун⁴, Н.В. Попов¹**МЕСТО ДЕЗИНСЕКЦИИ И ДЕРАТИЗАЦИИ В СИСТЕМЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ НАСЕЛЕНИЯ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ЧУМЫ НА ТЕРРИТОРИИ СТРАН СНГ**

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;
²Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика; ³Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Алматы, Республика Казахстан;
⁴ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», Иркутск, Российская Федерация

Природные очаги чумы – особо опасного трансмиссивного зооноза – широко распространены по всему миру, включая территории России и ряда сопредельных стран Центральной Азии. В 2000–2019 гг. в 21 стране мира отмечено 28339 случаев заболеваний чумой, смертность от болезни составила 8,0 %. Активные проявления чумы связаны с ростом численности носителей и переносчиков, увеличивающих риск инфицирования населения. Профилактические мероприятия по чуме, направленные на предупреждение и ликвидацию эпидемических очагов, включают целый комплекс (систему) мер. Наиболее радикальными из них остаются дезинсекция и дератизация. Контроль численности носителей и переносчиков чумы предусматривает ее снижение до уровней, при которых эпизоотии не развиваются, подавляются или ликвидируются. В настоящее время в России и странах СНГ при планировании и проведении истребительных мероприятий основное внимание акцентируют на полевой и поселковой дезинсекции. Снижение численности блох – носителей и переносчиков чумного микроба – приводит к нарушению эпизоотического процесса и, как следствие, обеспечению эпидемиологического благополучия по этому опасному заболеванию. Инсектицидные обработки в природных биотопах осуществляются порошковыми или аэрозольными средствами из групп пиретроидов, фосфорорганических соединений и фенилпиразолов с помощью современного оборудования: ранцевых дустеров, моторных воздуходувок, генераторов тумана. В населенных пунктах проводят влажную дезинсекцию с помощью разбрызгивателей. Полевая дератизация возможна только по эпидемиологическим показаниям на локальных участках эпизоотий в границах конкретных зараженных чумой поселений носителей. В качестве родентицидов используют приманочные средства на основе фосфида цинка или антикоагулянтов. При этом не допускается уничтожения ценных промысловых животных, узкоареальных и редких видов мелких млекопитающих. Поселковая дератизация обязательно проводится вместе с поселковой дезинсекцией. При планировании и проведении инсектицидных и родентицидных обработок первоочередное внимание уделяют безопасности обращения с химическими препаратами и недопущению их негативного воздействия на нецелевые виды животных.

Ключевые слова: чума, носители, переносчики, дезинсекция, дератизация.

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

Для цитирования: Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Слудский А.А., Ибрагимов Э.Ш., Абдикаримов С.Т., Мека-Меченко В.Г., Бердибеков А.Т., Никитин А.Я., Корзун В.М., Попов Н.В. Место дезинсекции и дератизации в системе неспецифической профилактики заболеваний населения в природных очагах чумы на территории стран СНГ. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:6–16. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-6-16
Поступила 24.04.20. Принята к публ. 18.05.20.

A.N. Matrosov¹, A.A. Kuznetsov¹, A.A. Sludsky¹, E.Sh. Ibragimov², S.T. Abdikarimov²,
V.G. Meka-Mechenko³, A.T. Berdibekov³, A.Ya. Nikitin⁴, V.M. Korzun⁴, N.V. Popov¹**The Role of Disinsection and Deratization in the Framework of Non-Specific Prophylaxis of Diseases among the Population in Natural Plague Foci in the Territory of the CIS Countries**

¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;
²Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections, Bishkek, Kyrgyz Republic;
³M. Aikimbaev National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections, Almaty, Republic of Kazakhstan;
⁴Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Natural foci of plague – a particularly dangerous transmissible zoonotic disease – are widely spread across the world, including in the territory of Russia and a number of neighboring countries in Central Asia. Between 2000 and 2019, 28339 cases of plague were registered in 21 states around the world; lethality rates reached 8 %. Active plague manifestations are associated with the increase in the abundance of carriers and vectors of the disease, which increases the risk of human infection. Prophylactic measures against plague are aimed at prevention and eradication of epidemic foci; they incorporate a whole complex (system) of activities. Disinsection and deratization remain the most radical of them. Control of the numbers of carriers and vectors of plague involves decrement up to the levels at which epizooties will not develop, they are suppressed and liquidated. Currently in the Russian Federation and CIS countries, the focus is

on the field and community disinsection when planning and performing exterminatory interventions. The decrease in the numbers of fleas – carriers and vectors of plague microbe – results in disruption of epizootic process and, consequently, in provision of epidemiological welfare as regards this dangerous disease. Insecticide treatments in natural biotopes are carried out using powder-like or aerosolized products, the class of pyrethroids, organophosphorous compounds and phenylpyrazoles by means of advanced equipment: knapsack dusters, power operated air blowers, and foggers. Within the boundaries of residential areas wet disinsection is performed with the help of spraying devices. Field deratization is allowed upon epidemiological grounds only, in localized territories of epizooties, within the boundaries of the settlements of plague infected carriers. Zinc phosphide- or anticoagulant-based bait products are used as rodenticides. Therewith, the eradication of valuable animal species, rare species of small mammals and endemic species is prohibited. Community deratization is always accompanied by the community disinsection. When planning and carrying out insecticide and rodenticide treatments the priority is given to the safety of handling the chemical preparations, to the exclusion of the negative effect on target animal species.

Key words: plague, carriers, vectors, disinsection, deratization.

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

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

Citation: Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Sludsky A.A., Ibragimov E.Sh., Abdikarimov S.T., Meka-Mechenko V.G., Berdibekov A.T., Nikitin A.Ya., Korzun V.M., Popov N.V. The Role of Disinsection and Deratization in the Framework of Non-Specific Prophylaxis of Diseases among the Population in Natural Plague Foci in the Territory of the CIS Countries. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:6–16. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-6-16

Received 24.04.20. *Accepted* 18.05.20.

Чума до настоящего времени остается одним из самых опасных трансмиссивных зоонозов в мире, требующих международного контроля. Даже единичные случаи заболеваний людей расцениваются как чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения. Первичные заражения, как правило, приводят к развитию бубонной формы чумы; при запоздалом диагнозе возможен переход во вторичную легочную форму, при которой наблюдается антропонозное распространение с летальными исходами. Редки, но очень опасны случаи септической формы чумы [1–3].

В 2000–2019 гг. случаи заболевания чумой регистрировали в 21 стране мира. Общее число больных составило 28339, смертность от болезни – 8,0 %. Наиболее напряженная обстановка (97 % случаев) складывалась в странах Африки: Мадагаскаре, Конго, Замбии, Уганде, Мозамбике, Танзании, Малави, Алжире и Ливии. В Америке заболевания отмечали в США, Перу, Боливии и Бразилии (362 случая). В Азии переболело 463 человека в 8 странах – Китае, Индонезии, Вьетнаме, Монголии, Индии, Казахстане, Кыргызстане и России [4–8]. Борьба с носителями и переносчиками чумы является одним из разделов неспецифической профилактики заболеваний населения в ее очагах [9, 10].

На территории Российской Федерации и стран бывшего СССР в зонах равнинных и горных степей, полупустынь и пустынь располагаются 45 природных очагов чумы, отличающихся по размерам, биоценотической и пространственной структуре, активности эпизоотических и эпидемических проявлений [11, 12]. Они характеризуются периодическими всплесками эпизоотической активности, сменяющимися более или менее выраженными межэпизоотическими периодами. При наличии возбудителя в биоценозах эпизоотические проявления возникают и развиваются на фоне высокой численности носителей и переносчиков чумного микроба. В последнее десятилетие наблюдается повышение активности

горных сурочьих и сусликовых природных очагов чумы в Центральной Азии [13–15]. Это обусловило появление спорадических случаев заболевания людей бубонной формой чумы, связанных с разделкой тушек сурков [16–19].

При эпидемических осложнениях стратегия и тактика надзора за чумой корректируются с учетом обеспечения эпидемиологической направленности всех обследовательских и противоэпидемических мероприятий [20]. На территории активных очагов в странах СНГ (Прикаспийский песчаный, Горно-Алтайский высокогорный, Тувинский горный, Центральнo-Азиатский пустынный, Тянь-Шаньский высокогорный) в 2003–2019 гг. проводился целый (единый) комплекс противоэпидемических и профилактических мероприятий. Наиболее радикальными из них остаются инсектицидные и родентицидные обработки, целью которых является подавление и ликвидация эпизоотий. Снижение численности носителей и переносчиков до уровня, при котором эпизоотический процесс прекращается, обеспечивает эпидемиологическое благополучие населения по этой опасной инфекции [16, 18].

В современный период происходит восстановление численности сурков, являющихся основными носителями чумы в горных очагах России и в сопредельных странах [17, 21–23]. В то же время эти ценные пушные зверьки – традиционный объект промысла местного населения и любительской охоты приезжих. Несмотря на запрет охоты на сурков на территориях природных очагов чумы, население ведет их несанкционированный промысел для использования в пищу и сбора жира, употребляемого в терапевтических целях. Экологические особенности сурков, связанные с пространственно-экологическими характеристиками их популяций, не могут обеспечить удовлетворительного родентицидного и противоэпизоотического эффекта истребительных мероприятий [24, 25].

В очагах чумы для подавления эпизоотий наи-

большой эффект дают меры борьбы с блохами – специфическими переносчиками и хранителями чумного микроба [19, 26]. В этих целях в настоящее время используют дусты, концентраты эмульсий, растворы или метод импрегнации материалов инсектицидами на основе фосфорорганических, пиретроидных соединений, фенилпиразолов. Длительность их пулцидного действия составляет 2–4 месяца, в ряде случаев – до 6 месяцев, а по некоторым наблюдениям – до трех лет [27]. Обработки устьев нор грызунов или зайцеобразных порошковидными препаратами осуществляют с помощью ранцевых распылителей, более эффективно глубокое пропыливание с помощью воздуходувок (моторных опыливателей) или аэрозольная с использованием генераторов горячего и холодного тумана [28].

Цель настоящего обзора – анализ опыта планирования и проведения экстренных мероприятий по дезинсекции и дератизации на территории природных очагов чумы в странах СНГ в современный период.

Проанализированы литературные источники, архивные и оперативные материалы противочумных учреждений, полученные при проведении профилактических мероприятий в очагах чумы, собственные данные, собранные в 2000–2019 гг. в процессе выполнения плановых научно-исследовательских разработок учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в Российской Федерации, а также учреждений Министерства здравоохранения Кыргызской Республики и Республики Казахстан.

В настоящее время в противочумную практику внедрены новые методы и подходы при проведении эпизоотологического мониторинга, по результатам которого осуществляют планирование профилактических мероприятий в очаге. Основными их элементами являются эпидемиологическая направленность, обеспечение точной картографической привязки пунктов размещения проб, моделирование и статистическое прогнозирование, использование аналитических и прогнозных карт [29–33].

Эпизоотологическое обследование в природных очагах чумы непосредственного профилактического эффекта не дает, но его результаты служат основой для всех исследовательских и профилактических работ. С учетом полученных сведений о численности и размещении носителей и переносчиков, эпизоотической обстановке, эпизоотологическом статусе грызунов и зайцеобразных, их кровососущих эктопаразитов, а также результатов эпидемиологических наблюдений за структурой, численностью, размещением, хозяйственной деятельностью населения и характером пребывания людей на контролируемой территории определяют содержание целого (единого) профилактического комплекса мероприятий. В него входят меры специфической профилактики: вакцинация населения и специфическое лечение больных. Они обязательно сочетаются с мероприятиями неспеци-

фической профилактики (режимно-ограничительные, санитарно-гигиенические и санитарно-технические), подготовкой медицинских и ветеринарных работников, информационно-разъяснительной работой среди населения. Отдельными ее разделами остаются дератизация и дезинсекция, направленные на контроль (регуляцию) численности мелких млекопитающих – носителей и кровососущих эктопаразитов – переносчиков чумного микроба, приводящие к подавлению или прекращению эпизоотий [25, 26, 34, 35].

Противочумные учреждения России и соседних стран за более чем столетний период деятельности накопили большой опыт по организации, планированию, содержанию и методологии проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий в очагах этой инфекции в разные периоды их активности. К настоящему времени его обобщение и анализ позволяют оценить эффективность противочумных мероприятий, предотвращающих риск заражения людей в природных очагах и заносов чумы с эндемичных по этой инфекции территорий других стран.

К 80-м годам XX столетия в практике противочумных учреждений накопились факты, свидетельствующие о неудовлетворительной противоэпизоотической и противоэпидемической эффективности широкомасштабных родентицидных обработок в поселениях мелких млекопитающих – носителей чумы [36–38]. Пришло понимание того, что метод «сплошных очисток» на больших территориях трудоемок и затратен, а в ряде случаев приводит к гибели нецелевых видов животных, включая редких и исчезающих [39, 40]. В поселениях мелких млекопитающих более целесообразно осуществлять инсектицидные обработки в очагах чумы: борьба с блохами дает более устойчивый эффект, предотвращая развитие эпизоотий или локализуя, сокращая их экстенсивность [41, 42].

В новейшей истории в природных очагах чумы на территории Казахстана, России, Кыргызстана и других стран СНГ ведущее место при проведении истребительных обработок против резервуарных животных приобретают дезинсекционные мероприятия [30, 35]. Вместе с тем активизация горных очагов Центральной Азии, где основными носителями выступают промысловые виды млекопитающих – сурки, привела к обострению обстановки из-за превалирования не трансмиссивного – контактного механизма заражения людей [13]. Но и в этом случае уничтожение блох в норах сурков, сусликов, песчанок и полевок вокруг стоянок животноводов, располагающихся на эпизоотических участках, снижает риск заражения людей.

На основании полученных данных хорошо прослеживается тенденция радикального сокращения объемов дератизационных обработок: они осуществляются только при наличии эпидемиологических показаний. Не ведутся работы по истреблению ценных промысловых и узкоареальных видов мелких

млекопитающих в очагах чумы. Основным методом борьбы с носителями чумы остается приманочный: в качестве действующего вещества применяют в основном антикоагулянты. В ряде случаев для достижения необходимого эффекта экстренной профилактики в периоды эпизоотических вспышек и заболеваний людей продолжают использовать родентицидные приманки с фосфидом цинка [43–45]. В то же время наращиваются объемы инсектицидных обработок против блох в поселениях основных носителей чумы: сусликов, песчанок и сурков. Основными методами дезинсекции в природных биотопах в поселениях зверьков служат обработки путем dustирования устьев нор или глубокое их пропыливание с помощью ранцевых дустеров и моторных опыливателей, а также импрегнация инсектицидами ветоши, затаскиваемой зверьками в гнезда (сибирские очаги). В населенных пунктах используют влажную дезинсекцию с помощью разбрызгивателей. В настоящее время в основном применяют пиретроидные препараты, их смеси с фосфорорганическими соединениями и фенилпиразолы.

На территории стран СНГ в настоящее время численность носителей и переносчиков чумы в равнинных сусликовых и песчаночьих, а также в полевых горных очагах чумы низкая, в то время как в сурочьих и сусликовых горных очагах она повышается. На этом фоне наблюдается снижение активности равнинных полупустынных (степных) и пустынных очагов чумы и рост таковой в горных природных очагах [3, 13, 14, 46].

Природные очаги чумы в Российской Федерации располагаются в полупустынной зоне Прикаспия и на Кавказе, в горах Южной Сибири и степном Забайкалье на площади 222377 км². По результатам мониторинговых исследований в 2012–2019 гг. лишь в четырех (из 11) очагах отмечалась эпизоотическая активность по чуме. В этот период в Горно-Алтайском высокогорном очаге выделено 153 штамма *Y. pestis pestis* на площади 1710 км², в Тувинском горном – 217 культур на 1841 км², в Восточно-Кавказском высокогорном – 4 культуры на 100 км², в Прикаспийском песчаном – 60 культур на 2300 км². При этом доля эпизоотической площади в Прикаспийском песчаном очаге составила 3,6 %, в Тувинском горном – 13,3 %, а в Горно-Алтайском высокогорном – 21,2 %.

В 2014–2016 гг. в Горно-Алтайском высоко-

горном очаге на территории Кош-Агачского района Республики Алтай зарегистрированы единичные случаи (по одному ежегодно) заболеваний человека бубонной формой чумы, связанные с заражением людей при разделке тушек больных серых сурков. Раннее выявление больных позволило своевременно купировать эпидемические очаги, успешно пролечить пациентов и не допустить антропонозного распространения инфекции [18, 20, 46]. Планирование и проведение адекватных обстановке профилактических и противоэпидемических мероприятий обеспечило эпидемиологическое благополучие населения в 2017–2019 гг. Приоритетным направлением истребительных мероприятий являлась дезинсекция в природных биотопах и населенных пунктах. Уничтожение серого сурка – ценного промыслового вида, а также длиннохвостого суслика, монгольской и даурской пищух не планировалось и не проводилось. В очаге осуществлялись только родентицидные обработки против домовой мыши в крупных населенных пунктах и плоскочерепной полевки внутри стоянок животноводов, располагающихся на эпизоотических участках [3, 47].

В очагах чумы на территории России за последние 30 лет заметно сокращались объемы химических обработок (табл. 1). Они планировались и проводились по типу экстренной профилактики в Прикаспийском песчаном, Горно-Алтайском высокогорном и Тувинском горном природных очагах.

За последнее десятилетие впервые объемы полевой дезинсекции превысили таковые полевой дератизации. В 2015–2019 гг. общая площадь барьерной дезинсекции вокруг стоянок животноводов, располагающихся на эпизоотических участках, составила 389,7 км², поселковой дератизации – 892,0 тыс. м², поселковой дезинсекции – 115,9 тыс. м². Пулецидная эффективность инсектицидных обработок в среднем составила 95,5 % (с колебаниями от 94,3 до 97,8 %). Эффективность поселковой дератизации и дезинсекции приближалась к 100 %: после обработок блохи и грызуны в поселках не обнаруживались. Противоэпизоотическая эффективность выражалась сокращением площади эпизоотий в 2–5 раз, а в ряде случаев прекращением эпизоотической активности, противоэпидемическая – обеспечением эпидемиологического благополучия населения по чуме.

В границах Республики Казахстан в настоящее

Таблица 1 / Table 1

Объемы дератизации и дезинсекции в природных очагах чумы на территории России в 1990–2019 гг.

Volumes of deratization and disinsection in natural plague foci in the territory of Russia in 1990–2019

Период (год) Period (year)	Дератизация Deratization		Дезинсекция Disinsection	
	полевая (км ²) field (km ²)	поселковая (тыс. м ²) community (thous. m ²)	полевая (км ²) field (km ²)	поселковая (тыс. м ²) community (thous. m ²)
1990–1999	4421,0	11017,6	129,0	1104,8
2000–2009	1779,0	8768,2	330,0	1007,1
2010–2019	115,6	3786,3	929,9	477,7

время выделяют 9 природных очагов чумы общей площадью около 1146000 км², включая группу из 12 автономных очагов в составе Центрально-Азиатского пустынного природного очага. Энзоотичная по чуме территория составляет 42 % от всей площади страны. В прошлом Казахстан неоднократно становился ареной эпидемических проявлений чумы, сопровождавшихся высокой смертностью населения. В 1975–2003 гг. здесь зарегистрировано 33 случая заболевания чумой среди населения, из которых 21 (63,6 %) закончился летально [1, 3, 12, 48]. В современный период с 2004 г. заболевания чумой среди населения не отмечаются, что связано с низкой эпизоотической активностью природных очагов на фоне сокращения численности носителей и переносчиков [49]. Большая часть природных очагов располагается здесь в зонах глинистых полупустынь, песчаных и щебнистых пустынь, где основными носителями чумы являются малый суслик, гребенщикова, полуденная, краснохвостая и большая песчанки, а переносчиками – их блохи. Большая часть культур чумного микроба всегда выделялась от блох – 68 %, что вдвое больше, чем от носителей. В горных очагах чумы резервуарными животными являются серый и красный сурки с их специфическими видами блох.

В 1989–2003 гг. социально-политические изменения в Казахстане привели к сокращению финансирования противочумных учреждений: объемы обследовательских и профилактических работ существенно снизились, что привело к эпидемическим осложнениям [43, 45, 50]. Огромные площади

эпизоотически активных очагов чумы, опасность дальнейшей эскалации эпидемических проявлений на территории республики потребовали увеличения финансовой поддержки профилактических мероприятий, поисков менее затратных, но эффективных приемов и средств борьбы с носителями и переносчиками чумы [30, 51]. С учетом многолетнего опыта противочумные учреждения Казахстана полностью отказались от проведения полевой дератизации. Все внимание акцентировалось на полевой дезинсекции, поселковой дератизации и дезинсекции (табл. 2).

Серьезной проблемой при планировании и проведении мер борьбы с грызунами в очагах чумы остается выбор родентицида в качестве действующего вещества. В противочумной системе бывшего СССР хорошо зарекомендовал себя фосфид цинка, относящийся к ядам острого действия (ЯОД). Предубеждение против него начало возникать с 70-х годов прошлого столетия в связи с выявлением фактов гибели нецелевых видов животных в результате широкомасштабного применения зерновых приманок для полевой дератизации. Антикоагулянты в природных биотопах в очагах чумы не применялись, что способствовало формированию ошибочного мнения об их безопасности.

Истребление грызунов в жилых и подсобных помещениях является одной из необходимых мер предохранения людей от заражения чумой. Встал вопрос о необходимости снижения концентрации фосфида цинка в приманках и его замены антикоагулянтами [52, 53]. В экстренных целях использова-

Таблица 2 / Table 2

Площади эпизоотий, объемы дератизации и дезинсекции в Центрально-Азиатском пустынном очаге чумы в Казахстане в 2003–2019 гг.

Epizootic areas, volumes of deratization and disinsection in the Central-Asian desert plague focus in Kazakhstan in 2003–2019

Год Year	Площадь эпизоотий, км ² The size of epizooties, km ²	Дератизация поселковая, тыс. м ² Community deratization, thous. m ²	Дезинсекция Disinsection	
			полевая, км ² field, km ²	поселковая, тыс. м ² community, thous. m ²
2003	48600	1864,1	579,8	763,9
2004	57700	1485,6	375,2	848,7
2005	34000	1707,4	371,5	1057,3
2006	27100	1633,1	320,4	688,0
2007	23600	1647,0	588,7	784,2
2008	35600	1482,0	753,5	640,0
2009	35400	1721,5	863,9	790,0
2010	46400	2322,3	888,8	1174,0
2011	53400	2111,9	625,9	1100,9
2012	39300	2150,7	604,7	928,5
2013	18700	1699,1	514,3	752,2
2014	21500	1930,4	612,6	685,2
2015	21700	1953,2	561,5	951,6
2016	13900	1841,3	393,1	639,7
2017	19100	2002,2	318,1	674,5
2018	10000	1965,8	317,1	672,7
2019	7000	1475,8	219,0	572,7

ние антикоагулянтов первого поколения, требующих многократных повторов обработок и длительного ожидания родентицидного эффекта, не оправдывает себя. Более рационально применять в населенных пунктах антикоагулянты второго поколения, обладающие высокой токсичностью, низкими концентрациями в приманках и не требующие повторных обработок. Отрицательным их свойством является вероятность вторичных отравлений нецелевых видов животных. Это особенно опасно при их использовании для борьбы с дикими грызунами в природных биотопах [54]. Многолетний опыт борьбы с грызунами в очагах чумы на территории Казахстана свидетельствует о том, что в настоящее время для проведения экстренных мер дератизации альтернативы использования в качестве родентицида фосфида цинка нет [43–45].

На протяжении ряда лет и до настоящего времени в очагах чумы Казахстана проводятся локальные обработки методами глубинного пропыливания нор и аэрозолизации колоний большой песчанки с применением современных средств дезинсекции: пиретроидных инсектицидов, фипрониловых дустов. Большое внимание уделяется решению проблемы поиска и применения более экономичных способов подачи инсектицидов в норы грызунов, сокращающих затраты на полевую дезинсекцию. Подача дустов осуществляется с помощью моторных опылителей. По результатам испытаний обосновано использование метода аэрозолизации нор большой песчанки инсектицидами в ультрамалых объемах с помощью генераторов горячего и холодного тумана, что в 5 раз дешевле, но также эффективно [27]. Для борьбы с блохами в поселениях малых песчанок и малого суслика использование моторных опылителей и генераторов тумана пока не рекомендуется: требуются дополнительные испытания и исследования [45].

Эффективность поселковой дератизации и дезинсекции при проведении зональных обработок в разных типах населенных пунктов удовлетворительная. В населенных пунктах при родентицидных обработках средняя величина доли погибших мышевидных грызунов составляла 92,6 %, пулецидная эффективность при инсектицидных обработках – до 100 %. Эффективность полевой дезинсекции в поселениях большой песчанки – 98,3 %.

Регулярное проведение дезинсекции и дератизации в объемах, определяемых с учетом эпидемиологической направленности мероприятий, и высокая их эффективность в природных очагах чумы на территории Казахстана, наряду с другими мерами профилактики, привели к снижению риска заболеваний населения в Центрально-Азиатском пустынном очаге: с 2004 г. на территории Казахстана эпидемических осложнений по чуме не наблюдалось.

На территории Кыргызской Республики выделяют пять высокогорных природных очагов чумы: Алайский, Таласский, Сарыджазский, Верхнена-

рынский и Аксайский, из которых три последних входят в группу Тянь-Шаньских высокогорных очагов. Общая площадь энзоотичной по чуме территории составляет 38100 км². Основными носителями чумного микроба здесь выступают серый и красный сурки. В Таласском очаге сурочье-полевочье типа последние культуры чумного микроба выделены в 1996 г. В остальных очагах, где основными носителями выступают сурки, штаммы возбудителя изолировали в 2008–2019 гг. от сурков и их специфических блох. За этот период в четырех очагах выделено 24 штамма чумного микроба на локальных участках общей площадью около 1000 км². Индекс эпизоотичности варьирует в разных очагах от 0,2 до 0,6.

Опыт борьбы с сурками в очагах чумы Кыргызстана в группе Тянь-Шаньских высокогорных очагов свидетельствует об отсутствии необходимого оздоровительного эффекта. Уничтожение сурков осуществлялось здесь в 30–60-х годах прошлого столетия с помощью отстрела, применения химических родентицидов (цианплав, хлорпикрин, бромистый метил), отлова капканами, но эпизоотии продолжали развиваться [55]. В последующем глубокое пропыливание нор сурков дустами на основе ДДТ в течение 18 лет позволило оздоровить около 80 % очаговой территории [16].

В современный период в Кыргызстане плотность эпизоотологического обследования очагов чумы сократилась. Эпизоотологический мониторинг осуществляется с учетом эпидемиологической направленности и складывающейся обстановки. Наиболее высокая эпизоотическая активность отмечается в Сарыджазском очаге чумы. В 2013 г. здесь зарегистрирован случай заболевания чумой со смертельным исходом. Заражение пятнадцатилетнего подростка в результате контакта с больным серым сурком произошло в августе перед залеганием зверьков в спячку. В конце июля 2014 г. в окрестностях чабанской стоянки семьи этого больного с помощью контрольных обследований выделено 3 штамма возбудителя чумного микроба от двух трупов серого сурка и блохи *Oropsylla silantiewi*, снятой с одного из них. Возобновление эпизоотической активности в 2013 г. с последующим заражением человека произошло на участке стойкого укоренения чумы. Первые культуры чумного микроба здесь зарегистрированы в 1944 г., в последующие годы эпизоотии на участке выявляли многократно. Истребление серых сурков на этой территории началось в 1955 г. и завершилось в 1972 г. Результатом этого явилось снижение активности эпизоотического процесса. Однако уже в 1977 г. от сурков и их эктопаразитов на данной территории выделено 26 культур чумного микроба. В 1978–1979 гг. в порядке заблаговременной профилактики этот участок обработали методом глубинной дезинсекции нор сурков дустом ДДТ. Анализ результатов проведенных дезинсекционных мероприятий 1980, 1986, 1997 и 2009 гг. показал их высокую противозооотийную и пулецидную эф-

Таблица 3 / Table 3

Объемы полевой дезинсекции (км²) в высокогорных природных очагах чумы на территории Кыргызской Республики в 2014–2019 гг.Volumes of field disinsection (km²) in high-altitude natural plague foci in the territory of Kyrgyzstan, 2014–2019

Год Year	Сарыджазский очаг Saridzhas focus	Верхненарынский очаг Upper-Naryn focus	Акса́йский очаг Aksai focus	Алайский очаг Alai focus
2014	500	-	-	-
2015	500*	-	500	-
2016	-	500	500*	100
2017	-	500	500	100*
2018	-	-	500*	100
2019	-	500	500	100*
Итого: Total:	500	1500	1500	200

* – в том числе повторно.

* – Including repeatedly.

фективность, в связи чем до 2013 г. эта территория не обследовалась. Случай заражения человека произошел в результате восстановления численности серого сурка и его блох. В 2014–2015 гг. на участке эпидосложнения на площади 500 км² проведена двукратная полевая дезинсекция нор сурков методом глубокого пропыливания пиретроидными дустами с помощью моторных опыливателей.

В настоящее время на территории четырех природных очагов Кыргызской Республики на всех участках выделения культур возбудителя чумы, а также на местах стойких эпизоотических проявлений планируется и проводится только полевая дезинсекция по типу экстренной профилактики заболеваний населения (табл. 3).

Обращает на себя внимание то, что эти работы проводились в больших объемах: за последние 6 лет, без учета повторов, на данной территории обработано около 3700 км². Пулецидная эффективность в высокогорных природных очагах Тянь-Шаня и Памиро-Алая оценивалась на основании сравнения показателей индексов обилия и индексов встречаемости блох в шерсти и гнездах сурков. На территории Алайского мезоочага она приближалась к 100 %, в то время как в очагах Тянь-Шаньской группы численность блох снижалась незначительно. Такие различия в эффективности требуют объяснения и изучения. Одна из возможных причин этого – различие сравниваемых участков по уровню влажности.

За последние три года единичные культуры чумного микроба выделялись на локальных участках только в 2 очагах: в Сарыджазском (2 штамма) и в Аксайском (3 штамма) высокогорных природных очагах. Планирование объемов и участков проведения полевой дезинсекции осуществляется по показаниям и ежегодно корректируется с учетом конкретной эпизоотической обстановки.

Одной из проблем оценки результатов инсектицидных и родентицидных обработок является определение их эффективности. Ранее основным критерием качества работ считалась техническая эф-

фективность, выражаемая долей погибших особей в группировках, которые подвергались воздействию дератизации или дезинсекции. В настоящее время учитывают противозпиоотический и противозпидемический эффект борьбы с носителями и переносчиками. Подавление или прекращение эпизоотий, а также ликвидация эпидемического очага по месту проведения истребительных обработок считаются удовлетворительным результатом. Для вычисления технической эффективности дератизации и дезинсекции сравнивают численность зверьков или блох до проведения обработок и после них с учетом экспозиции действия химических препаратов. При проведении экстренных мероприятий не всегда имеется возможность заблаговременного осуществления учетов на местах обработок. В данном случае сравнивают данные учетов на опытных и контрольных участках. В качестве последних используют результаты учетов в те же сроки на участках, схожих по природным условиям, где обработки не проводились.

Учеты численности носителей проводят стандартными методами: по результатам визуального подсчета зверьков с дневной активностью или плотности жилых нор (бутанов, колоний, городков) на маршрутах, по вылову на площадках или ловушколах, а также по учету заслеженности контрольных площадок и др. Эффективность полевой дератизации считают удовлетворительной при достижении родентицидного эффекта у 80 % и более особей группировки. При поселковой дератизации необходимо добиваться полного уничтожения синантропных грызунов. В ряде случаев результаты родентицидных обработок признают эффективными при достижении низкой остаточной численности зверьков до уровней, при которых эпизоотический процесс не развивается.

Численность блох в помещениях учитывают с помощью клеевых листов, в природных биотопах – по индексу обилия в шерсти зверьков, во входах их нор и гнездах. В ряде случаев полные раскопки нор млекопитающих для получения данных об общем за-

пасе блох (суммарное количество насекомых в шерсти зверьков, во входах нор и гнездах) достаточно трудоемки либо не позволяют получать достоверные данные из-за малых выборок. Затруднения вызывают полные раскопки колоний большой песчанки, гнезд сурков в горных поселениях. На практике в оперативной работе в этих случаях применяют сравнительные показатели численности блох (индексы обилия, индексы встречаемости) в устьях нор [20, 48]. Результаты полевой дезинсекции считаются удовлетворительными при достижении пулецидного эффекта 90 % и выше.

Многолетний опыт по эпидемиологическому надзору за чумой в России, Казахстане, Кыргызстане и других прилегающих странах свидетельствует о том, что в условиях освоения новых земель, роста сельскохозяйственного производства, развития туризма, интенсивных грузо- и пассажиропотоков нельзя решить все проблемы по защите населения от этой опасной инфекции только с помощью мер специфической профилактики. В связи с этим их обязательно сочетают с мероприятиями неспецифической профилактики. Планирование, организация и проведение профилактических и противоэпидемических мер в активных очагах чумы предусматривает реализацию целого комплекса (системы) мероприятий, содержание которых должно быть адекватно конкретной эпидемиологической обстановке. Очаговая дезинфекция, дезинсекция и дератизация остаются самыми радикальными методами снижения интенсивности эпизоотического процесса и ликвидации эпизоотий. При планировании и проведении экстренных мероприятий контроля численности носителей и переносчиков чумы необходимо смещать акценты на проведение инсектицидных обработок на территориях риска инфицирования населения. Родентицидные обработки следует осуществлять только по эпидемиологическим показаниям в населенных пунктах и их окрестностях.

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. 192 с.
2. Bramanti B., Stenseth N.C., Walle L., Lei X. Plague: A disease which changed the path of human civilization. *Yersinia pestis: Retrospective and Perspective*. Dordrecht: Springer; 2016. P. 1–26.
3. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Обеспечение эпидемиологического благополучия в природных очагах чумы на территории стран СНГ и Монголии в современных условиях. Ижевск: ООО «Принт»; 2018. 336 с. DOI: 10.23648/PRNT.2445.
4. Josko D. *Yersinia pestis*: still a plague in the 21st century. *Clin. Lab. Sci.* 2004; 17(1):25–9.
5. Gage K.L., Kosoy M.Y. Natural History of Plague Perspectives from More than a Century of Research. *Annual Review of Entomology*. 2005; 50:505–28.
6. Lloyd-Smith J.O., George D., Pepin K.M., Pitzer V.E., Pulliam J.R., Dobson A.P., Hudson P.J., Grenfell B.T. Epidemic dynamics at the human-animal interface. *Science*. 2009; 326(5958):1362–7.
7. Riehm J.M., Vergnaud G., Kiefer D., Damdindorj T., Dashdavay O., Khurelsukh T., Zöller L., Wölfel R., Le Flèche P., Scholz H.C. *Yersinia pestis* Lineages in Mongolia. *PLoS One*. 2012;

- 7(2):e30624. DOI: 10.1371/journal.pone.0030624.
8. Bertherat E. Plague around the world, 2010–2015. *Weekly epidemiological record*. 2016; 91(8):89–104.
9. Barnes A.M. Surveillance and control of bubonic plague in the United States. *Proc. Symp. Zool. Soc. London*. 1982; 50:237–68.
10. Wang Zuwang, Zhang Zhibin. Theory and Practice of Rodent Pest Management. Science Press Beijing; 1996. 378 p.
11. Сапожников В.И., Сержан О.С., Безверхний А.В., Ковалева Г.Г., Копбаев Е.Ш. Чума в Балхаш-Алакольской впадине. Алматы: АО «Рахат»; 2001. 140 с.
12. Кутырев В.В., Попова А.Ю., редакторы. Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 год). Саратов: ООО «Амирит»; 2016. 248 с.
13. Вержуцкий Д.Б. Активизация природных очагов чумы в Центральной Азии: беспочвенные опасения или реальная угроза. *Природа внутренней Азии*. 2018; 1(6):7–17. DOI: 10.18101/2542-0623-2018-1-7-18.
14. Попов Н.В., Карнаухов И.Г., Пакскина Н.Д., Ерошенко Г.А., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Поршаков А.М., Корзун В.М., Косилко С.А., Григорьев М.П., Дубянский В.М., Зенкевич Е.С., Попов В.П., Лопатин А.А., Аязбаев Т.З., Ибрагимов Э.Ш., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Оценка современной эпидемиологической обстановки в природных очагах чумы мира. Повышение эффективности эпидемиологического надзора в природных очагах чумы Российской Федерации и прогноз их эпизоотической активности на 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 1:81–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-81-88.
15. Балахонов С.В., Вержуцкий Д.Б., редакторы. Тувинский природный очаг чумы. Иркутск: Изд-во ИГУ; 2019. 286 с.
16. Ибрагимов Э.Ш., Усенбаев Н.Т. Динамика эпизоотической активности мезоочагов Сарыджасского автономного очага чумы. *Вестник Кыргызской государственной мед. академии им. Ахунбаева*. Бишкек; 2014. С. 37–40.
17. Абдикаримов С.Т., Ибрагимов Э.Ш., Эгембергенов Ч.Э. Современное эпизоотическое состояние природных очагов чумы Кыргызской Республики и мероприятия, направленные на обеспечение эпидемиологического благополучия по чуме. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 2:40–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-45-48.
18. Балахонов С.В., Корзун В.М., Косилко С.А., Михайлов Е.П., Щучинов Л.В., Мищенко А.И., Зарубин И.В., Рождественский Е.Н., Денисов А.В. Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия по чуме населения Республики Алтай. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 4(89):42–8. DOI: 10.31631/2037-3046-2016-15-4-42-48.
19. Попова А.Ю., Балахонов С.В., Щучинов Л.В., Матросов А.Н., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Шефер В.В., Шестаков В.А., Рождественский Е.Н., Чипанин Е.В., Корзун В.М., Косилко С.А., Иннокентьева Т.И., Ярыгина М.Б., Сбитнева С.В., Тагизова С.Л., Архипов Г.С., Щербакова С.А., Топорков В.П., Куклев Е.В., Раздорский А.С., Кузнецов А.А., Слудский А.А., Попов Н.В., Ермаков Н.М., Кутырев В.В. Организация противоэпидемических и профилактических мероприятий по чуме на территории Кош-Агачского района Республики Алтай и оценка их активности. *Инфекционные болезни*. 2018; 16(4):5–15. DOI: 10.20953/1729-9225-2018-4-5-15.
20. Попова А.Ю., Кутырев В.В., Балахонов С.В., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Попов Н.В., Косилко С.А., Дубровина В.И., Корзун В.М., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Бугоркова С.А., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Топорков В.П., Слудский А.А., Раздорский А.С., Матросов А.Н., Поршаков А.М., Лопатин А.А., Щербакова С.А. Координация мероприятий противочумных учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в 2016 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 4:5–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-5-10.
21. Алтыбаев К.И., Кулназаров Б.К. Современное состояние популяций красного сурка (*Marmota caudata*) в Алайском природном очаге чумы. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. Алматы. 2004; 1(9):54–8.
22. Балахонов С.В., Корзун В.М., редакторы. Горно-Алтайский природный очаг чумы: Ретроспективный анализ, эпизоотологический мониторинг, современное состояние. Новосибирск: Наука-Центр; 2014. 272 с.
23. Адьяасурен З., Цэрэнноров Д., Мягмар Ж., Ганхуяг Ц., Отгонбаяр Д., Баяр Ц., Вержуцкий Д.Б., Ганболд Д., Балахонов С.В. Современная ситуация в природных очагах чумы Монголии. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2014; 25:22–5.
24. Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Князева Т.В. Экологические аспекты контроля численности грызунов в природных очагах чумы на территории Российской Федерации. *Экология*. 2011; 4:266–71.
25. Ибрагимов Э.Ш. Неспецифическая профилактика в Тянь-Шанском высокогорном природном очаге чумы: прошлое

и настоящее. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4:18–21. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-18-21.

26. Ибрагимов Э.Ш., Бахвалов В.Ф., Воротников И.А., Шварц А.И. Глубинная дезинсекция нор сурков и миграция ДДТ в объекты окружающей среды. *Природная очаговость и профилактика зоонозов*. Саратов; 1987. С. 91–3.

27. Никитин А.Я., Кардаш А.И. Возможность использования некоторых пиретроидов для профилактики чумы в природных очагах Сибири сусликового типа. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2009; 4:42–4.

28. Бурделов Л.А., Жумадилова З.Б., Мека-Меченко В.Г., Сажнев Ю.С., Акимбаев Б.А., Сайлаубекулы Р., Абдукаримов Н., Белая А.И., Наурузбаев Е.О., Сапожников В.И., Агеев В.С., Пакулева Е.В. Итоги трехлетних полевых испытаний аэрозолей нор большой песчанки (*Rhombomys opimus*) в ультрамалых объемах. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. Алматы. 2014; 1(29):14–21.

29. Никитин А.Я., Вершинин Е.А., Нечаева Л.К. Статистические приемы краткосрочного прогноза колебаний численности блох в природных очагах чумы. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. Алматы. 2001; 3:192–5.

30. Бурделов Л.А., Дернова В.Ф. Состояние противочумной работы в Республике Казахстан на современном этапе и перспективы ее улучшения. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. Алматы. 2003; 1(7):3–16.

31. Дубянский В.М. Концепция использования ГИС-технологий и дистанционного зондирования в эпиднадзоре за чумой. *Врач и информационные технологии*. 2012; 3:42–6.

32. Дубянский В.М., Куличенко А.Н., Семенко О.В., Малецкая О.В., Мезенцев В.М. Совершенствование эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями с использованием геоинформационных систем. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2014; 1:85–91.

33. Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Поршаков А.М., Слудский А.А., Ковалевская А.А., Топорков В.П. Принципы картографической дифференциации и эпидемиологического районирования природных очагов чумы для задач оценки и минимизации рисков здоровья населения. *Анализ риска здоровью*. 2018; 4:96–104. DOI: 10.21668/health.risk/2018.4.11.

34. Вержуцкий Д.Б., Никитин А.Я., Ковалева Н.И., Галацевич Н.Ф., Чумакова Н.А., Ткаченко С.В., Чумаков А.В. Основные результаты дезинсекции в долине реки Саглы (Тувинский природный очаг чумы). *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2014; 25:18–22.

35. Гражданов А.К., Матросов А.Н. История и современное состояние полевой профилактики чумы на Западе Казахстана. *Пест-Менеджмент*. 2015; 2:5–10.

36. Протопопян М.Г. Проблема оздоровления природных очагов чумы. В кн.: *Профилактика природно-очаговых инфекций*. Ставрополь; 1983. С. 415–7.

37. Руденчик Ю.В., Солдаткин И.С. История борьбы с природной очаговостью чумы. Отечественные уроки. В кн.: *Занимательные очерки о деятельности и деятели противочумной системы России и Советского Союза*. М.: Информатика; 1995. С. 60–86.

38. Дятлов А.И. Перспективы борьбы с чумой в ее природных очагах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2001; 6:64–6.

39. Шевченко В.Л., Дубянский М.А. О случаях отравления птиц зерновыми приманками с фосфидом цинка. *Экология*. 1988; 1:85–7.

40. Шилова С.А. Популяционная экология как основа контроля численности мелких млекопитающих. М.: Наука; 1993. 201 с.

41. Протопопян М.Г. Полевая дезинсекция в природных очагах чумы СССР. Эпидемиология, эпизоотология и профилактика особо опасных инфекций. Саратов; 1986. С. 55–68.

42. Сурвилло А.В., Корнеев Г.А., Волков В.М., Нужный А.И., Кочкарева А.В., Зубов В.В. Испытание новых инсектицидных препаратов в Среднеазиатском природном очаге чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1993; 3(73):65–71.

43. Бурделов Л.А., Мека-Меченко В.Г., Бурделов Д.Л. Некоторые общие проблемы борьбы с грызунами и пути их решения на современном этапе. *Сибирь-Восток*. 2001; 3(39):9–14.

44. Парфенов А.В. Проблемы применения антикоагулянтов при проведении дератизации с целью профилактики чумы. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. Алматы. 2014; 2(30):65–70.

45. Мека-Меченко В.Г. Современное положение с профилактикой чумы в Республике Казахстан. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. Алматы. 2019; 1(38):23–9.

46. Корзун В.М., Балахонов С.В., Косилко С.А., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Чипанин Е.В., Базарова Г.Х., Ярыгина М.Б., Абибулаев Д.Э., Шефер В.В. Особенности эпизоотической и эпидемической активности Горно-Алтайского природного очага чумы в 2012–2016 годах. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 1(92):36–8. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-1-92-36-38.

47. Балахонов С.В., Щучинов Л.В., Мищенко А.И., Матросов А.Н., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Корзун В.М., Косилко С.А., Тагызова С.Л., Топорков В.П., Попов Н.В., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Организация профилактических, противоэпидемических мероприятий в целях снижения риска осложнения эпидемиологической ситуации по чуме на территории Республики Алтай. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2018; 6:85–94. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-6-85-94.

48. Айкимбаев А.М., Сагиев З.А. Эпидемический потенциал природных очагов чумы в Казахстане. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. Алматы. 2004; 2(10):34–7.

49. Есжанов А.Б., Мека-Меченко В.Г., Саякова З.З., Садовская В.П., Мека-Меченко Т.В., Асылбек А.М. Об эпизоотической активности Среднеазиатского пустынного очага чумы на территории Республики Казахстан в 2017–2018 гг. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. Алматы. 2019; 1(38):57–63.

50. Белоног А.А., Жолшоринов А.Ж. О состоянии заболеваемости особо опасными инфекциями среди населения и принимаемых мерах по ее стабилизации в Республике Казахстан. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. Алматы. 2004; 2(10):13–5.

51. Кузнецов А.Н., Сыздыков М.С., Ерубаев Т.К. Оценка комплексной системы эпидемиологического надзора за чумой в Казахстане. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. Алматы. 2019; 2(39):3–10.

52. Сурвилло А.В., Корнеев Г.А. Проблемы неспецифической профилактики в природных очагах чумы на современном этапе. *Дезинфекционное дело*. 1993; 2–3:29–32.

53. Бурделов Л.А., Шурубур П.В., Пак И.Г. Дератизация и дезинсекция в системе профилактических противочумных мероприятий на современном этапе. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1994; 6(76):59–67.

54. Карякин И.В. Катастрофические последствия дератизации с использованием бромдиолона в Монголии в 2001–2003 гг. для российских популяций птиц. *Пест-Менеджмент*. 2010; 1(73):20–6.

55. Бибиков Д.И., Берендяев С.А., Пейсахис Л.А., Шварц Е.А. Природные очаги чумы сурков в СССР. М.: Медицина; 1973. 192 с.

References

- Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia and Siberia]. Moscow: "Meditsina"; 2004. 192 p.
- Bramanti B., Stenseth N.C., Walle L., Lei X. Plague: A disease which changed the path of human civilization. *Yersinia pestis: Retrospective and Perspective*. Dordrecht: Springer; 2016. P. 1–26.
- Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Ensuring Epidemiological Well-Being in Natural Plague Foci in the Territory of the CIS Countries and Mongolia under Modern Conditions]. Izhevsk: "Print" LLC; 2018. 336 p. DOI: 10.23648/PRNT.2445.
- Josko D. *Yersinia pestis*: still a plague in the 21st century. *Clin. Lab. Sci.* 2004; 17(1):25–9.
- Gage K.L., Kosoy M.Y. Natural History of Plague Perspectives from More than a Century of Research. *Annual Review of Entomology*. 2005; 50:505–28.
- Lloyd-Smith J.O., George D., Pepin K.M., Pitzer V.E., Pulliam J.R., Dobson A.P., Hudson P.J., Grenfell B.T. Epidemic dynamics at the human-animal interface. *Science*. 2009; 326(5958):1362–7.
- Riehm J.M., Vergnaud G., Kiefer D., Damdindorj T., Dashdavaa O., Khurelsukh T., Zoller L., Wölfel R., Le Flèche P., Scholz H.C. *Yersinia pestis* Lineages in Mongolia. *PLoS One*. 2012; 7(2):e30624. DOI: 10.1371/journal.pone.0030624.
- Bertherat E. Plague around the world, 2010–2015. *Weekly epidemiological record*. 2016; 91(8):89–104.
- Barnes A.M. Surveillance and control of bubonic plague in the United States. *Proc. Symp. Zool. Soc. London*. 1982; 50:237–68.
- Wang Zuwang, Zhang Zhibin. Theory and Practice of Rodent Pest Management. Science Press Beijing; 1996. 378 p.
- Sapozhnikov V.I., Serzhan O.S., Bezverkhny A.V., Kovaleva G.G., Kopbaev E.Sh. [Plague in the Balkhash-Alakol Depression]. *Almaty: "Rakhat" JSC*; 2001. 140 p.
- Kutyrev V.V., Popova A.Yu., editors. [Cadastral of Epidemic and Epizootic Manifestations of Plague in the Territory of the Russian Federation and Former Soviet Union (1876–2016)]. *Saratov: "Amir" LLC*; 2016. 248 p.
- Verzhutsky D.B. [Activation of natural plague foci in Central Asia: groundless fears or a real threat]. *Priroda Vnutrenney Azii [Nature of Inner Asia]*. 2018; 1(6):7–17. DOI: 10.18101/2542-0623-2018-1-7-18.
- Popov N.V., Karnaukhov I.G., Paksina N.D., Eroshenko G.A., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Porshakov A.M., Kouklev E.V., Ivanova A.V., Korzun V.M., Kosilko S.A., Zenkevich E.S., Popov V.P., Lopatin A.A., Ayazbaev T.Z., Balakhonov S.V., Kutyrev V.V. [Analysis of the Current Epidemiological Situation in Natural Plague Foci around the World. Enhancement of the Effectiveness of

Epidemiological Surveillance in Natural Plague Foci of the Russian Federation and Forecast of their Epizootic Activity for 2019]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (1):81–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-81-88.

15. Balakhonov S.V., Verzhutsky D.B., editors. [Tuva Natural Plague Focus]. Irkutsk: Publishing House of Irkutsk State University; 2019. 286 p.

16. Ibragimov E.Sh., Usenbaev N.T. [Dynamics of epizootic activity of mezzofoci of the Sarydzhas Autonomous plague focus]. *Vestnik Kyrgyzskoy Gosudrastvennoy Meditsinskoy Akademii im. Akhunbayeva [Bulletin of the Kyrgyz State Medical Academy Named after Akhunbayev]*. Bishkek; 2014. P. 37–40.

17. Abdikarimov S.T., Ibragimov E.S., Egembergenov C.E. Current Epizootic Condition of Natural Plague Foci in Kyrgyz Republic and Measures Aimed at Provision of Epidemiological Welfare as regards Plague. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (2):45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-45-48.

18. Balakhonov S.V., Korzun V.M., Kosilko S.A., Mikhailov E.P., Shchuchinov L.V., Mishchenko A.I., Zarubin I.V., Rozhdestvensky E.N., Denisov A.V. [Topical issues of ensuring epidemiological well-being of the population as regards plague in the Altai Republic]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2016; 4(89):42–8. DOI: 10.31631/2037-3046-2016-15-4-42-48.

19. Popova A.Yu., Balakhonov S.V., Shchuchinov L.V., Matrosov A.N., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Shefer V.V., Shestakov V.A., Rozhdestvensky E.N., Chipanin E.V., Korzun V.M., Kosilko S.A., Innokent'eva T.I., Yarygina M.B., Sbitneva S.V., Tagyzova S.L., Arkhipov G.S., Shcherbakova S.A., Toporkov V.P., Kouklev E.V., Razdorsky A.S., Kuznetsov A.A., Sludsky A.A., Popov N.V., Ermakov N.M., Kutyrev V.V. [Organization of anti-epidemic and preventive measures as regards plague in the territory of the Kosh-Agach District of the Altai Republic and assessment of their activity]. *Infektsionnye Bozleni [Infectious Diseases]*. 2018; 16(4):5–15. DOI: 10.20953/1729-9225-2018-4-5-15.

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

21. Altybaev K.I., Kulnazarov B.K. [Current status of red marmot populations (*Marmota caudata*) in the Alai natural plague focus]. *Karantinnyye i Zoonoznyye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. Almaty. 2004; 1(9):54–8.

22. Balakhonov S.V., Korzun V.M., editors. [Gorno-Altai Natural Plague Focus: Retrospective Analysis, Epizootiological Monitoring, Current Status]. Novosibirsk: "Nauka-Tsentr"; 2014. 272 p.

23. Ad"yaasuren Z., Tserennorov D., Myagmar Zh., Ganhuayag C., Otgonbayar D., Bayar Ts., Verzhutsky D.B., Ganbold D., Balakhonov S.V. [The current situation in the natural plague foci of Mongolia]. *Dal'nevostochnyy Zhurnal Infektsionnoy Patologii [Far Eastern Journal of Infectious Pathology]*. 2014; 25:22–5.

24. Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Knyazeva T.V. [Ecological aspects of rodent population control in natural plague foci in the territory of the Russian Federation]. *Ekologiya [Ecology]*. 2011; 4:266–71.

25. Ibragimov E.S. Non-Specific Prophylaxis in the Tien Shan High-Mountain Natural Plague Focus: Past and Present. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (4):18–21. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-18-21.

26. Ibragimov E.Sh., Bakhvalov V.F., Vorotnikov I.A., Shvartz A.I. [Deep disinsection of groundhog burrows and DDT migration to environmental objects]. In: [Natural Health and Prevention of Zoonoses]. Saratov; 1987. P. 91–3.

27. Nikitin A.Ya., Kardash A.I. [Possibility of using certain pyrethroids for the prevention of plague in natural foci of Siberia of gopher type]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnyye Bozleni [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2009; 4:42–4.

28. Burdelov L.A., Zhumadilova Z. B., Meka-Mechenko V.G., Sazhnev Yu.S., Akimbaev B.A., Sailaubekuly R., Abdurkarimov N., Belyaev A.I., Nauruzbaev E.O., Sapozhnikov V.I., Ageev V.S., Pakuleva E.V. [Results of three-year field tests of aerosolization of great gerbil burrows (*Rhombomys opimus*) in ultra-small volumes]. *Karantinnyye i Zoonoznyye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. Almaty. 2014; 1(29):14–21.

29. Nikitin A.Ya., Vershinin E.A., Nechaeva L.K. [Statistical techniques for short-term forecasting of flea population fluctuations in natural plague centers]. *Karantinnyye i Zoonoznyye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. Almaty. 2001; 3:192–5.

30. Burdelov L.A., Dernovaya V.F. [The state of anti-plague activities in the Republic of Kazakhstan at the present stage and prospects for its improvement]. *Karantinnyye i Zoonoznyye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. Almaty. 2003; 1(7):3–16.

31. Dubyansky V.M. [Concept of using GIS technologies and remote sensing in plague surveillance]. *Vrach i Informatsionnyye Tekhnologii [Physician and IT]*. 2012; 3:42–6.

32. Dubyansky V.M., Kulichenko A.N., Semenko O.V., Maletskaya O.V., Mezentsev V.M. [Improving epidemiological surveillance of infectious diseases using geo-information systems]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2014; 1:85–91.

33. Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Porshakov A.M., Sludsky A.A., Kovalevskaya A.A., Toporkov V.P. [Principles of cartographic differentiation and epidemiological zoning of natural plague foci for assessing and minimizing public health risks]. *Analiz Riska Zdrov'yu [Health Risk Analysis]*. 2018; 4:96–104. DOI: 10.21668/health.risk/2018.4.11.

34. Verzhutsky D.B., Nikitin A.Ya., Kovaleva N.I., Galatsevich N.F., Chumakova N.A., Tkachenko S.V., Chumakov A.V. [The main results of disinsection in the valley of the Sagly river (Tuva natural plague focus)]. *Dal'nevostochnyy Zhurnal Infektsionnoy Patologii [Far Eastern Journal of Infectious Pathology]*. 2014; 25:18–22.

35. Grazhdanov A.K., Matrosov A.N. [History and current state of field prophylaxis of plague in the West of Kazakhstan]. *Pest-Management [Pest Management]*. 2015; 2:5–10.

36. Protopyan M.G. [The problem of sanitation of natural plague foci]. In: [Prophylaxis of Natural Focal Infections]. Stavropol; 1983. P. 415–7.

37. Rudenchik Yu.V., Soldatkin I.S. [History of the fight against the natural focality of plague. Domestic experience]. In: [Entertaining Essays on the Activities and Figures of the Anti-Plague System of Russia and the Soviet Union]. Moscow: "Informatika"; 1995. P. 60–86.

38. Dyatlov A.I. [Prospects for fighting the plague in its natural foci]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2001; 6:64–6.

39. Shevchenko V.L., Dubyansky M.A. [Concerning the cases of poisoning of birds with grain baits with zinc phosphide]. *Ekologiya [Ecology]*. 1988; 1:85–7.

40. Shilova S.A. [Population Ecology as the Basis for Controlling the Numbers of Small Mammals]. Moscow: "Nauka"; 1993. 201 p.

41. Protopyan M.G. [Field pest control in natural plague foci of the USSR]. In: [Epidemiology, Epizootiology and Prevention of Particularly Dangerous Infections]. Saratov; 1986. P. 55–68.

42. Survillo A.V., Korneev G.A., Volkov V.M., Nuzhny A.I., Kochkareva A.V., Zubov V.V. [Testing of new insecticidal preparations in the Central Asian natural plague center]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 1993; (3(73)):65–71.

43. Burdelov L.A., Meka-Mechenko V.G., Burdelov D.L. [Some common problems of rodent control and ways to solve them at the present stage]. *Sibir-Vostok [Siberia-East]*. 2001; 3(39):9–14.

44. Parfenov A.V. [Problems of using anticoagulants during deratization for the purpose of plague prevention]. *Karantinnyye i Zoonoznyye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. Almaty. 2014; 2(30):65–70.

45. Meka-Mechenko V.G. [The current situation on the prevention of plague in the Republic of Kazakhstan]. *Karantinnyye i Zoonoznyye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. Almaty. 2019; 1(38):23–9.

46. Korzun V.M., Balakhonov S.V., Kosilko S.A., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Rozhdestvensky E.N., Chipanin E.V., Bazarova G.Kh., Yarygina M.B., Abibulaev D.E., Shefer V.V. [Features of the epizootic and epidemic activity of the Gorno-Altai natural focus of plague in 2012–2016]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2017; 1(92):36–8. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-1-92-36-38.

47. Balakhonov S.V., Schuchinov L.V., Mishchenko A.I., Matrosov A.N., Denisov A.V., Rozhdestvensky E.N., Korzun V.M., Kosilko S.A., Tagyzova S.L., Toporkov V.P., Popov N.V., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. [Organization of preventive, anti-epidemic measures in order to reduce the risk of complications of the epidemiological situation on plague in the territory of the Altai Republic]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2018; 6:85–94. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-6-85-94.

48. Akimbaev A.M., Sagiev Z.A. [The epidemic potential of natural plague foci in Kazakhstan]. *Karantinnyye i Zoonoznyye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. Almaty. 2004; 2(10):34–7.

49. Eszhanov A.B., Meka-Mechenko V.G., Sayakova Z.Z., Sadovskaya V.P., Meka-Mechenko T.V., Asylbek A.M. [About the epizootic activity of the Central Asian desert plague focus in the Republic of Kazakhstan in 2017–2018]. *Karantinnyye i Zoonoznyye*

Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]. Almaty. 2019; 1(38):57–63.

50. Belonog A.A., Zholshorinov A.Zh. [About the state of incidence of particularly dangerous infections among the population and the measures taken to stabilize it in the Republic of Kazakhstan]. *Karantinnye i Zoonoznye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. Almaty. 2004; 2(10):13–5.

51. Kuznetsov A.N., Syzdykov M.S., Erubaev T.K. [Assessment of the comprehensive plague surveillance system in Kazakhstan]. *Karantinnye i Zoonoznye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. Almaty. 2019; 2(39):3–10.

52. Survillo A.V., Korneev G.A. [Problems of nonspecific prevention in natural foci of plague at the present stage]. *Dezinfektsionnoe Delo [Disinfection Affairs]*. 1993; 2–3:29–32.

53. Burdelov L.A., Shurubura P.V., Pak I.G. [Deratization and pest control in the system of preventive anti-plague measures at the present stage]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 1994; (6(76)):59–67.

54. Karyakin I.V. [The catastrophic consequences of deratization using bromadiolone in Mongolia in 2001–2003 for Russian bird populations]. *Pest-Management [Pest Management]*. 2010; 1(73):20–6.

55. Bibikov D.I., Berendyaev S.A., Peysakhis L.A., Schwartz E.A. [Natural Foci of the Marmot Plague in the USSR]. Moscow: “Meditsina”, 1973. 192 p.

Authors:

Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Sludsky A.A., Popov N.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Ibragimov E.Sh., Abdikarimov S.T. Republican Center for Quarantine and Especially Dangerous Infections. 92, Scriabin St., Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: esibragimov@mail.ru.

Meka-Mechenko V.G., Berdibekov A.T. M. Aikimbayev National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections. 14, Zhahanger St., Almaty, Republic Kazakhstan. E-mail: info@nncooi.kz.

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

Об авторах:

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

Ибрагимов Э.Ш., Абдикаримов С.Т. Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Кыргызской Республики. Кыргызская Республика, Бишкек, ул. Скрябина, 92. E-mail: esibragimov@mail.ru.

Мека-Меченко В.Г., Бердибеков А.Т. Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева Министерства здравоохранения Республики Казахстан. Республика Казахстан, Алматы, ул. Жахангер, 14. E-mail: info@nncooi.kz.

Никитин А.Я., Корзун В.М. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-17-26

UDC (Universal Decimal Classification) 616.932(540+470)

E.V. Monakhova¹, A. Ghosh², A. Mutreja³, F.-X. Weill⁴, T. Ramamurthy²**Endemic Cholera in India and Imported Cholera in Russia: What is Common?**

¹Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation; ²ICMR-National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata, India; ³Department of Medicine, University of Cambridge, Cambridge, UK; ⁴Institut Pasteur, Unité des bactéries pathogènes entériques, Paris, France

Abstract. The endemicity of cholera in India has been well researched. Among the other endemic areas, Indian sub-continent appears to be the cradle of *Vibrio cholerae* genovariants, which subsequently spread worldwide. In contrast, all the cholera cases recorded in Russia are of imported origin. In the past century, such importations might result in epidemics, which, however, ended with elimination of toxigenic *V. cholerae* (TVC) from the affected areas. Currently, the incidence of TVC in water reservoirs or infected returnees from Asian countries are rare events, mostly due to constant surveillance activities. Furthermore, the climatic conditions in the majority of Russian regions are unfavorable for long-term environmental survival of the pathogen. On the other hand, global shifts in climate accompanied by unexpected anomalies in previously stable climatic zones may promote dissemination of imported TVC and emergence of cholera. In some regions of Russia, seasonal weather patterns are pretty similar to Indian. Molecular studies of isolates from diverse territories show that TVC have been introduced into new areas and acquired additional traits, absent in their ancestors.

This article describes genomic characteristics of TVC isolates from Russia, India and some other countries. The review is complemented by bioinformatics analysis of important genetic markers to discriminate between clones that emerged in endemic regions and were imported into cholera-free locations. We have found more evidence in support of primary Indian origin of recent genovariants and their ongoing transformation, including the emergence of a new *rtxA* gene allele with a 60 bp deletion in addition to the previously known null mutation. In certain conditions, TVC could pose a potential threat of spreading epidemic cholera into Russia and other territories. Cholera control requires joint efforts of researchers to learn more about the pathogen at the molecular level for developing effective strategies to protect the humankind throughout the world.

Key words: *Vibrio cholerae*, genovariants, Haitian strains, endemicity, genetic markers.

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interest, either of a financial or non-financial character, related to the present article.

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

Citation: Monakhova E.V., Ghosh A., Mutreja A., Weill F.-X., Ramamurthy T. Endemic Cholera in India and Imported Cholera in Russia: What is Common? *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2020; 3:17–26. (In English). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-17-26

Received 20.08.20. **Revised** 01.09.20. **Accepted** 09.09.20.

Monakhova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9216-7777>

Ghosh A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2323-8735>

Mutreja A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1118-8075>

Weill F.-X., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9941-5799>

Ramamurthy T., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7999-5036>

Е.В. Монахова¹, А. Ghosh², А. Mutreja³, F.-X. Weill⁴, Т. Ramamurthy²**ЭНДЕМИЧНАЯ ХОЛЕРА В ИНДИИ И ЗАВОЗНАЯ ХОЛЕРА В РОССИИ: ЧТО ОБЩЕГО?**

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

²ICMR-National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata, India; ³Department of Medicine, University of Cambridge, Cambridge, UK; ⁴Institut Pasteur, Unité des bactéries pathogènes entériques, Paris, France

Эндемичность холеры в Индии хорошо изучена. Среди ряда других эндемичных регионов Индийский субконтинент, по-видимому, является местом формирования нескольких вариантов холерных вибрионов, впоследствии распространившихся по всему миру. Напротив, в России все зарегистрированные случаи холеры имели завозное происхождение. В прошлом столетии такие завозы могли приводить к эпидемиям, которые заканчивались вместе с элиминацией токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* (TVC) из пораженных регионов. В настоящее время выделение TVC как из водоемов, так и от возвратившихся из азиатских стран больных, является редкостью, в основном благодаря постоянному мониторингу и контролю. Кроме того, климатические условия большинства областей России неблагоприятны для длительного выживания возбудителя во внешней среде. Однако глобальные изменения климата, сопровождающиеся неожиданными аномалиями в ранее стабильных климатических зонах, могут способствовать распространению отдельных завозных TVC, что может привести к эпидемиологическим осложнениям по холере. В некоторых регионах России сезонные погодные условия очень похожи на индийские. Молекулярные исследования штаммов из разных мест выделения показывают, что TVC распространились на новые территории и приобрели дополнительные свойства, отсутствующие у их недавних предшественников.

В настоящей работе описаны геномные характеристики TVC, выделенных в России, Индии и некоторых других странах. Обзор дополнен биоинформатическим анализом генетических маркеров, значимых для дифференциации клонов, появившихся в эндемичных регионах и завезенных на территории, где холера прежде отсутство-

вала. Мы нашли добавочные свидетельства в пользу первичного индийского происхождения недавно возникших геновариантов и их продолжающейся трансформации, включая появление нового аллеля гена *rtxA* с делецией 60 п.н. в дополнение к ранее известной null-мутации. В определенных условиях TVC могут представлять потенциальную угрозу распространения эпидемической холеры в России и на других территориях. Борьба с холерой требует совместных усилий исследователей, направленных на получение знаний о возбудителе на молекулярном уровне, в целях разработки эффективных стратегий защиты человечества во всем мире.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, геноварианты, гаитянские штаммы, эндемичность, генетические маркеры.

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

Для цитирования: Монахова Е.В., Ghosh A., Mutreja A., Weill F.-X., Ramamurthy T. Эндемичная холера в Индии и завозная холера в России: что общего? Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 3:17–26. (Англ. яз.) DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-17-26
Поступила 20.08.20. Отправлена на доработку 01.09.20. Принята к публ. 09.09.20.

The problem of cholera remains acute in many developing countries mainly due to poor sanitation and hygiene, inadequate healthcare and lack of surveillance structures. In the developed countries, however, the risk of infection remains extremely low, mainly due to cholera control measures. Nevertheless, mass migration of human population, international travel and maritime movement bring about the danger of importation of toxigenic *V. cholerae* (TVC) to cholera-free locations. Current global shifts in climate accompanied by unexpected anomalies in previously stable climatic zones may promote dissemination of occasionally imported TVC and emergence of cholera outbreaks. The global spread of *V. cholerae* strains with detailed molecular characteristics have been described in numerous publications, but in those studies only a few Russian isolates have been included in the bioinformatics analysis of whole genome sequences (WGSs) [1–5].

While cholera is endemic in the Indian subcontinent, in Russia it is usually associated with the introduction of TVC from abroad. Considering this public health challenge of both the countries, in this article, we focus on the characteristics of TVC isolates from India, Russia and some other affected countries to determine their origin and possible routes of transmission, as well as to estimate the risks of outbreaks in case of new importations. We used relevant published information and performed bioinformatics analysis of certain genes to obtain a comprehensive view on the cholera scenario in Russia and India.

Brief historical account on emergence and spread of cholera: origins and importations

Though severe enteric diseases closely resembling cholera were known in the Indian subcontinent from ancient times, the first recorded cholera epidemic happened in Bengal in 1817. It then spread subsequently to many neighboring Asian countries. All six cholera pandemics of the 19th and 20th centuries, caused by *V. cholerae* of classical biotype, reached Russia entering from the south through the Volga river system causing millions of deaths [6]. Epidemic cholera reached northern and central Europe, including Russia, by 1829. Later, both Americas were affected as well. Although the pathogen was “traveling” from country to country by multiple routes, initial source of infection was primarily undivided India [7].

In spite of the fact that the emergence of the El Tor biotype and the start of the 7th pandemic (7P) has traditionally been attributed to Indonesia [7–10], some “grey areas” remain regarding its primary origin in the absence of sequence information of the “old” strains isolated in different countries. It was presumed that after its initial appearance in the Middle East the ancestor of the 7P lineage migrated to Indonesia, where it acquired the *Vibrio* seventh-pandemic islands (VSP-I and VSP-II) [9]. Indeed, the two VSPs are absent from the WGSs of Indonesian 1937 isolates (JZCB01, JRBD01 and others), but are present in 1957 Indonesian isolates A6 (CVSG01) and C5 (CP013301), the “oldest” of the 7P strains that could be obtained [4, 11, 12]. However, an “older” strain, A1M (SRR6027668), isolated from a cholera patient in Thailand in 1956, with all El Tor attributes and both VSPs has been recently sequenced and used in genomic analysis [12, 13]. In the light of above finding it seems that the 7P lineage could have emerged in another country and eventually found favorable conditions for epidemic spread from Indonesia in 1961. On the other hand, Pham *et al.* [12] presumed that this strain in fact might be isolated in 1961–1962, as on the phylogenetic tree it grouped with isolates of these years. Unfortunately, till now, there are no more El Tor WGSs of strains (including Indian) isolated before 1961 in NCBI databases, they have not been described in any publications either. Islam *et al.* [14] pointed out that the role of the Middle East and/or Indonesia in the evolution of the 7P strains is highly speculative as it is based on the analysis of a very few genomes. Hence, WGS-based studies using an old collection of strains, if available, is likely to be of much help in identifying the “lost links” in the origin of 7P strains.

During early 1990s, emergence and spread of a new serogroup *V. cholerae* O139 was reported from the Indian subcontinent, which soon disseminated across Asia and reached a number of other countries [10]. However, the expected beginning of the eighth pandemic of O139 cholera did not occur [7].

Tracing the history of cholera in Russia makes it evident that both classical and El Tor as well as O139 strains were imported into Russia from abroad. The last recorded classical cholera epidemic in Russia happened in 1942–1943, caused by an attenuated clone with low epidemic potential due to genomic alterations [15]. The source of importation of this strain was not known, but as during the Second World War people from

many USSR Republics and other territories moved with armies through the country, it is most likely that the mass movement of population would have been the source of the strain. El Tor reached Russia in 1969 and caused a few local outbreaks, but in 1970 and onwards it began to spread intensively into many regions and the Republics of the former USSR. This spread was due to importation of cholera from a number of Asian countries, including India [16]. Since early 2000s, no outbreaks had been recorded in spite of a few sporadic importations through infected returnees from Asia or the rare occurrence of TVC of unknown origin in natural water reservoirs [17, 18]. However, the risk of outbreaks in the future still exists, which demands not only a constant update on cholera morbidity in other countries but also data on the characteristics of dominant pandemic strains.

Endemicity of cholera

Cholera is known to be endemic in the South Asian countries, especially in India and Bangladesh, where infections occur every year [19]. An area is considered to be endemic for cholera, if diarrheal samples from a population there are positive for *V. cholerae* at least in 3 out of the past 5 years [20]. During 1990–2007, 11 of the 28 Indian States were found to be endemic for cholera [21]. A previous report indicated sporadic cholera cases and outbreaks in 35 States in India between 1997 and 2006 [22]. Further analysis of morbidity of cholera during 2010–2015 identified 13 States as endemic [23]. In summary, while the endemic status of certain States in India, such as West Bengal, Maharashtra, Andhra Pradesh appeared to be perennial, in others (Gujarat, Karnataka, Chandigarh, Odisha, Punjab etc.) it could change in different periods of time. Cholera cases appeared sporadically in “non-endemic” States as well. Totally, 78 districts in 15 States were identified as “hotspots” (with an increased risk of the disease) based on observational data and 111 districts in 9 States from model-based predicted number of cases by 2015 [23]. However, from scattered yearly reports, it seems that the entire Indian subcontinent may be considered as endemic for cholera.

In Russia, the previous cholera outbreaks, as well as the more recent sporadic cases, were caused by imported *V. cholerae* O1 El Tor. In the 20th century, such importations occurred frequently, followed by the fast spread of the pathogen, which resulted in outbreaks of cholera with different levels of morbidity in many Eurasian regions of Russia and other USSR Republics; in Ukraine and Siberia in 1970s, in the Far East in 1990s, and in the Republic of Dagestan in 1994 [3, 16, 24]. Only 4 imported *V. cholerae* O139 cholera cases were recorded in 1993 in Rostov region. Of these, 3 were from India, the origin of the remaining one was unknown. However, all isolates had the same genotype as the Indian “prototype O139”.

In 2001, an outbreak of El Tor cholera with 52 clinical cases and 18 carriers occurred in Kazan city in the Republic of Tatarstan [3]. Occasional cholera due to in-

fectured returnees from Asian countries, presumably from India, was also reported (Bashkortostan, 2004; Tver, 2005; Murmansk, 2006; Moscow, 2010, 2012, 2014). However, cholera has not spread from these sporadic cases. In 2011, an outbreak of cholera took place in neighboring Ukraine (33 patients and 24 carriers) due to visit of tourists and/or seamen. The disease occurred as multiple sporadic cases and did not extend outside Mariupol city; the infection was controlled and eliminated in about 3 months. Nonetheless, more than 50 % of patients displayed severe symptoms of cholera [25, 26].

A number of cases had been imported into the Russian Federation and Ukraine from other Asian countries – Kazakhstan, Tajikistan, China, Bangladesh (via Turkey), Syria and, presumably, from Iran or other Middle East areas [3, 24, 27, 28]. Some of them share endemic status and a few had originated in other endemic regions, like China, which played an important role in the global cholera expansion. Chinese isolates emerged either from endemic sources of TVC within the country or from the transiently imported strains. China, thus, acted as a “sink” or an “amplifier” of epidemic spread [29]. Although unverified, a similar role of non-endemic Asian countries cannot be ruled out. As for the Middle East, it has always played a role in the dissemination of *V. cholerae* due to mass visits of Muslim pilgrims (Hadj) from many countries where cholera is endemic [7, 8]. The 1994 epidemic of cholera in Dagestan happened due to the returnees from Hadj pilgrimage via several Asian countries (Jordan-Syria-Turkey-Iran-Azerbaijan). Retrospective molecular analysis revealed multiple importations of diverse clones at different stages of the epidemic [3].

Toxigenic *V. cholerae* in the environment

An important factor that contributes to cholera endemicity is habitation of *V. cholerae* in the local environments and independence of occurrence of the disease in humans on the importation from outside. The mechanism by which cholera becomes endemic is reliant on the nature of environmental reservoirs [22]. The strategies of survival of *V. cholerae* in natural water sources are governed by associations with phyto- and zooplankton, biofilm formation, transition to non-culturable state etc. [30–32].

In endemic countries, cholera continues to occur due to hot climate, poor sanitation and natural reservoirs of infection. Survival of TVC in such environments is thought to be the possible reason for recurrent annual epidemics in the Indian subcontinent [33]. Several investigations carried out in India during cholera outbreaks showed that TVC were present in samples collected from the affected areas [34–36]. A similar trend was also observed in Russia, where TVC strains were usually found in the environment during the epidemic period and for a short subsequent interval. It has been presumed that Rostov region, Siberia and the Far East have unique ecological niches conducive to the survival of both non-

toxigenic *V. cholerae* and TVC [37]. Considering the epidemics of cholera in the USSR (Astrakhan, Kerch, Rostov-on-Don, Omsk, Barnaul) in the second half of the past century as well as in 2001 (at Kazan), the term “temporary enrooting” was used to describe such intermittent epidemic outbreaks. However, the reason behind the “temporary enrooting” of transient TVC in Russia in the absence of epidemiological evidence still remains elusive. The survival ability of the pathogen outside the human host due to biofilm formation has so far been studied only in experimental conditions, although close to those normally existing in the Russian natural waters [38]. Until now, only one evidence of environmental survival of a toxigenic clone has been known, i.e. isolation of clonal *V. cholerae* strains in Rostov-on-Don from sewage and water from different sites within 2 weeks in 2001. It appears that the pathogen might have originated from patients/carriers and escaped the wastewater treatment process. It is worth mentioning here that even in other cholera endemic regions like Haiti, the concept of environmental TVC and their role in reemerging of cholera after 2010 is not very clear. The sources of outbreaks have not been fully ascertained due to insufficient information. However, it seems reasonable to assume that both water contamination and infected individuals could be the prime factors for the transmission of cholera during outbreaks [39–41].

Based on the genome analysis, epidemic strains circulating in the population during outbreaks are found to be largely distinct from the other *V. cholerae* in the aquatic environment [42, 43]. However, non-toxigenic vibrios seem to help in the emergence of new TVC clones via genetic transfer. Biofilms formed by *V. cholerae* on chitinous surfaces provide favorable niches for recombination events to take place [44]. It was hypothesized, that clonal shifting in *V. cholerae* is driven chiefly by environmental variations rather than by human-borne dissemination [45]. This hypothesis seems relevant at least for endemic countries where TVC are often present in aquatic environments, while its extrapolation to non-endemic areas is yet untimely.

Seasonality, climate, natural disasters and human made calamities

In endemic countries cholera morbidity usually reaches its peak during specific months every year, i.e., displays definite seasonal patterns [14, 46]. For instance, in Bangladesh cholera maintains an annual cycle with two infection peaks – before and just after monsoon, which is linked to changing physico-chemical and biotic factors. These seasonal outbreaks correlate with phytoplankton blooms, which, possibly aid in the increase of cell number of zooplankton-associated TVC [14]. In India epidemic periods also occur during warmer water temperatures in combination with elevated pH and plankton blooms. They are usually linked to pre-monsoon and/or monsoon periods as well. Also, non-seasonal cholera outbreaks occur due to unforeseen sewage

leaks from municipality pipelines and contamination of drinking water sources [34, 36, 45]. In addition, cholera outbreaks often follow natural disasters, such as earthquakes, cyclones, tsunamis, floods and river erosion [47]. The Haitian epidemic in 2010 also occurred after a massive earthquake [8, 45, 48]. Nevertheless, according to the recent reports (<https://www.who.int/wer/en>), cholera morbidity has reduced significantly in India.

In Russian Federation and neighboring Ukraine, most recorded epidemic outbreaks of cholera took place during hot seasons and were associated with pollution of natural water reservoirs with sewage or fecal contamination by infected humans [3, 17, 25, 26]. In Stavropol the main cause of cholera outbreak was contamination of a mineral spring by Syrian workers via waste waters [16, 17]. In Tatarstan it happened due to an accident at the gravity collector which resulted in the runoff of sewage into a pond used for bathing (<http://healthnation.ru/index.php?view=article&id=821>). Although the source of the appearance of TVC in sewage was not defined, it could be a consequence of the importation by Hadj returnees in Tatarstan regions (as in Dagestan in 1994). A similar situation took place in 2014 in Kalahandi district of Odisha, India, where fecal contamination of water reservoir used for recreation led to a large cholera outbreak [49].

Overall there is a vast climatic difference between India and Russia. However, in southern parts of the Russian Federation, the weather conditions closely resemble those of certain Indian States, especially during summer months. Besides, against the backdrop of global warming, climate abnormalities are becoming more frequent with the increase in temperatures even in the northern regions, or the submergence of large flood-free locations due to heavy rainfalls. Seasonal floods, usual for a number of riverine regions, and devastating hurricanes occur every year in different areas in large territory of Russia. Earthquakes, though not regular, have been registered as well. These natural calamities cause severe damage of infrastructures resulting in potable water shortage, unsanitary conditions and thus enhance the possibility of the spread of infectious diseases. Nearly the same consequence may also be caused by technological disasters. Therefore, the possibility that the long-term “inter-epidemic” period (from 2002 till today) may come to an end in Russia cannot be totally ruled out, particularly because the currently predominating highly virulent new genetic variants of *V. cholerae* seem to possess better fitness for environmental survival [50].

Molecular insights into the variability of main epidemicity markers in TVC

Regardless of the overall high plasticity of the *V. cholerae* genome, certain mutations in essential genes/gene clusters become conserved in 7P sublineages, which replace each other and come to occupy a dominant position in the epidemiology of cholera. These markers, proposed by a number of authors, include al-

les of *rstR*, *rstB*, *ctxB* (classical or El Tor type) in the CTX prophages, *tcpA* in the VPI pathogenicity island (prototype El Tor or CIRS101 variants), *rtxA*, encoding the synthesis of the multifunctional-autoprocessing repeat-in-toxin (MARTX) (prototype allele *rtxA1* or truncated *rtxA4*), numbers of heptad repeats (TTTTGAT) at the *ctxAB* operon promoter region (from 3 to 5), mutations in *gyrA* and *parC* genes responsible for quinolone resistance, and structure of the VSP-II island (prototype or with deletion of the central part – VSP-II^{Δ0495-0512}) [8, 51–53].

Table 1 summarizes existing information on several genetic traits of toxigenic El Tor strains isolated in the Russian Federation and a few other countries. These data were added to our own analysis results to fill in discrete traits, which are absent in the cited publications. TVC O139 are not included, because our examination of two Russian 1993 isolates when compared with other two strains received from India (1993) and one from Kyrgyzstan (1994) showed the same genotype – *ctxB3*, *rstR*^{El Tor}, *tcpA*^{El Tor}, *rtxA1*, prototype *gyrA*, *parC*, intact VSP-II and 3 heptad repeats. After early 1990s there has been no subsequent importations of O139 serogroup into the Russian Federation.

TVC strains isolated in the last century in Russian Federation from the cholera outbreaks were found to contain prototype genetic traits (including *ctxB3* allele of El Tor type) commonly present in TVC strains worldwide. The last Russian strain of such genotype was isolated in 2000 from river water. Based on the amino acid arrangement in the deduced products of *ctxB* gene of *V. cholerae*, more than ten CT genotypes (*ctxB* alleles) have been reported [10]. *V. cholerae* O1 strains isolated during the Siberia and the Far East cholera epidemics in 1970s, had *ctxB3* allele, whereas the strains isolated during 1990s possessed *ctxB1* (classical genotype) [24]. Classical *ctxB1* was also identified in the 1990s isolates from the environment, sporadic imported cases, outbreaks in Tatarstan and epidemics in Dagestan. Although this CT genotype was almost displaced all over the world by new sublineages, some of them still managed to continue till 2016, as evidenced by their isolation from 3 indigenous cholera cases associated with raw seafood consumption in South Korea and also from the sea water collected from the coastal area near the affected places (UWOX01, UWOZ01, UWOQ01 UWOY01) [54]. In Bangladesh, during 2013–2014, strains of similar CT genotype (*ctxB1*) briefly outcompeted the currently prevailing lineage (*ctxB7*), which had been dominant in the country since 2008 [55]. The *ctxB1* allele was also shared by strains isolated during 2012–2017 in Iran (ERR2269835-2269838), Iraq (ERR2265655-2265660), Democratic Republic of the Congo (ERR2265650-51) and South Sudan (ERR2265667-2265673) [56].

In early 2000s, the second altered trait accompanying the first one (*ctxB1*) – VSP-II^{Δ0495-0512}, was identified in a few Russian environmental isolates. This was followed later by the identification of “CIRS101-like” genotype containing along with *ctxB1* and

VSP-II^{Δ0495-0512} new alleles of *tcpA*^{CIRS101} and *rtxA* with a null mutation G13602A in the strains sporadically imported into the country. Such strains appeared in India in 2004 and within the same year moved to Russia. The SNP in *rtxA* gene in these strains led to the formation of a premature stop codon, completing synthesis of the protein, the C-terminus of which is shortened by 12 amino acid residues (aa). This variant has been designated as *rtxA4* and shown experimentally to have lost its biological activity against eukaryotic cells [57]. It was suggested that the acquired ability to produce CT of classical type makes the functioning of high molecular weight MARTX redundant due to its elevated energy expenditure, and its inactivation is likely to be in favor of energy conservation to ensure rapid cell multiplication and successful dissemination [57].

“Haitian” strains and identification of a new allele of the *rtxA* gene

A new variant of *V. cholerae* El Tor possessing the *ctxB7* allele, which differed from the classical *ctxB1* by an additional mutation at position 58 of *ctxB*, was first identified in the strains that caused the large-scale epidemic in Haiti of 2010 and was designated as Haitian *ctxB* [51]. However, later on it was proved that this new type of *ctxB* allele actually first emerged in Kolkata, India during 2006 and then probably moved to other parts of India and then via Nepal reached Haiti [58]. The 58th position mutation resulted in His20Asn substitution in the signal peptide of the CtxB7 protein which was shown to play a pivotal role in heightened CT production by “Haitian” strains as compared to other TVCs, hence enhancing their epidemic potential [59]. In 2010, the rare imported cholera cases in Russia as well as the 2011 outbreak in neighboring Ukraine were caused by the “Haitian variant” strains [1, 2, 60, 61]. These strains as well as the other isolates from India, Bangladesh and Russia from 2010 also harbored *tcpA*^{CIRS101}, *rtxA4* and VSP-II^{Δ0495-0512} (Table 1). Along with these common genetic markers, some traits unique to Haitian isolates, which were absent in the Indian isolates, were described that included 3-nucleotide deletion in the *rstB* gene absent in Indian isolates and a difference in the number of heptad repeats in the *ctxA* promoter regions (4 in Indian and 5 in Haitian strains) [52]. This deletion mutation in *rstB* is a characteristic of the *rstB1* of the RS1 prophage present in most of the El Tor strains. Our analysis of WGSs (data not shown) further confirmed this. Some of the Russian isolates had both *rstR1* (classical type) and *rstR2* (El Tor type), while others, including the Haitian isolates, contained 2 copies of *rstR2*. We further confirmed that they belonged to CTX and RS1 when both prophages were arranged in the same contig (Table 1). Presence of a single copy of prophage in some of the isolates might reflect the incompleteness of their genome assembly. As for the heptad repeats, 5 repeats were found in one isolate imported to Moscow from India in June 2010 [1], before the start of Haitian outbreak (in late October) and also

Table 1

Distribution of genetic markers among *V. cholerae* strains of different origin

Strain	Origin	Gene alleles						VSP-II	TR No.	Ref.
		<i>ctxB</i>	<i>tcpA</i>	<i>rtxA</i>	<i>rstR</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>			
5879 ^{PQB01}	Taganrog-72←USSR ←Iran or India	3	ET	1	2x4	pt	pt	pt	4	-
8228 ^{ERR1878614}	Kerch-74←Iran or India	3	ET	1	2	pt	pt	pt	4	4
GP152 ^{CWQ01}	India-79	3	ET	1	2	pt	pt	pt	4	4
14450 ^{ERR1878615} , 14451 ^{ERR1878616}	Stavropol'-90←Syria	3	ET	1	2,2	pt	pt	pt	4	4
18252	Rostov-00	3	ET	1	2	pt	pt	pt	4	-
PRL64 ^{CWQ01}	India-92	1	ET	1	2,2	G248T	C254T	pt	4	4
I-1181 ^{LUCN02}	Novosib.reg.-94←Turkey←Bangladesh	1	ET	1	2,1	pt	pt	pt	4	24
I-1187 ^{LYXT02}	Barnaul-94←India	1	ET	1	2	G248T	pt	pt	4	24
I-1263 ^{JPLT02}	Irkutsk reg.-97 ← Kazakhstan	1	ET	1	2	G248T	pt	Δ495-498	3	24,28
R17644 ^{JRTW01}	Achinsk/Krasnoyarsk ter.-97←Kazakhstan	1	ET	1	2	G248T	pt	Δ495-498	3	27
I-1300 ^{JZCC02}	Sakhalin-99←China	1	ET	1	2,1	pt	pt	pt	4	24
16228, 17261, 17290	Dagestan-94←Asia	1	ET	1	2,1	pt	pt	pt	4	3
17296	Dagestan-94←Asia	1	ET	1	2	G248T	pt	pt	4	3
18329, 18336	Kazan'-01	1	ET	1	2	G248T	pt	pt	4	3
18337	Kazan'-01	1	ET	1	2,2	G248T	pt	pt	4	3
18847	St.Petersburg-05	1	ET	1	2,1	pt	pt	pt	4	-
18367, 18368, 18369	Rostov-01	1	ET	1	2	G248T	pt	Δ495-512	4	-
18588	Rostov-03	1	ET	1	2,1	pt	pt	Δ502-512	4	-
CIRS101 ^{ACVW01}	Bangladesh-02	1	CIRS	4	2	G248T	pt	Δ495-512	3	51
M1429 ^{LAEM01}	Beloretsk/Bashkortostan-04←Tajikistan	1	CIRS	4	2	G248T	C254T	Δ495-512	4	27
18826 ^{AYOM01}	Tver-05←Tajikistan	1	CIRS	4	2	G248T	C254T	Δ495-512	4	27
18899 ^{LAKM01}	Murmansk-06←India	1	CIRS	4	2	G248T	C254T	Δ495-512	4	27
0707M ^{VMQ01}	China-07	1	CIRS	4	2	G248T	C254T	Δ495-512	4	9
301 ^{AJFN02}	Taganrog-11	1	CIRS	4	2	G248T	C254T	Δ495-512	4	18
THSTI_31698 ^{ERR2269927}	India-12	1	CIRS	4	2,2	G248T	C254T	Δ495-512	4	56
81 ^{JRQM01, JPOP01}	Rostov-14	1	CIRS	4	2,2	G248T	C254T	Δ495-512	4	18
IDHO1_726 ^{CWQ01}	India-09	7	CIRS	4	2,2	G248T	C254T	Δ495-512	4	4
THSTI_02834 ^{ERR1880727} THSTI_02959 ^{ERR1880728}	India-10	7	CIRS	4	2,2	G248T	C254T	Δ495-512	4	4
NHCC-010F ^{APGD01}	Bangladesh-10	7	CIRS	4	2	G248T	C254T	Δ495-512	4	-
19187 ^{AYNM01}	Moscow-10←India	7	CIRS	4	2	G248T	C254T	Δ495-512	4	60
19188 ^{JNGU01}	Moscow-10←India	7	CIRS	4	2,1	G248T	C254T	Δ495-512	4	60
19191 ^{JNGT01}	Moscow-10←India	7	CIRS	4	2,1	G248T	C254T	Δ495-512	5	60
1792 ^{AELJ01} , 1798 ^{AELJ01}	Haiti-10	7	CIRS	4	2	G248T	C254T	Δ495-512	5	51,52
2010AA-151 ^{JSTB01}	Haiti-11	7	CIRS	4	2	G248T	C254T	Δ495-512	5	51,52
2012HC-35 ^{JSUD01}	Haiti-12	7	CIRS	4	2	G248T	C254T	Δ495-512	5	-
31 ^{LJFF01} , 76 ^{MPVL01} 39 ^{LJFG01} , 186 ^{PYBQ01}	Ukraine(Mariupol)-11	7	CIRS	4	2	G248T	C254T	Δ495-512	4	2,61
THSTI_26866 ^{ERR2269923} THSTI_26871 ^{ERR2269924}	India-11	7	CIRS	4	2,2	G248T	C254T	Δ495-512	5	56
THSTI_26907 ^{ERR22699225}	India-11	7	CIRS	4	2,2	G248T	C254T	Δ495-512	4	56
THSTI_32676 ^{ERR2269928}	India-12	7	CIRS	4	2,2	G248T	C254T	Δ495-512	4	56
THSTI_33102 ^{ERR2269929}	India-12	7	CIRS	4a	2,2	G248T	C254T	Δ495-512	4	56
6878 ^{AYNL01}	Moscow-12←India	7	CIRS	4a	2	G248T	C254T	Δ495-512	4	60
W4-13 ^{NIWX001}	India-13	7	CIRS	4a	2	G248T	C254T	Δ495-512	4	-
THSTI_36124, 36133, 36136, 36268 ^{ERR2269930, 44-46}	India-13	7	CIRS	4a	2,2	G248T	C254T	Δ495-512	4	56
CNRVC140176 ^{ERR2265649} THSTI_41049, 41055, 41081 ^{ERR2269947-49}	India-14	7	CIRS	4a	2,2	G248T	C254T	Δ495-512	4	56
3265 ^{JRQL01}	Moscow-14←India	7	CIRS	4a	2	G248T	C254T	Δ495-512	4	61

Red font designates clinical strains; green – environmental, black – unknown origin; WGSs or ERRs from NCBI are supplied by accession numbers as superscripts. ET – El Tor, C – classical, pt – prototype, TR No. – the number of tandem TTTTGAT repeats in the promoter region of *ctxA*. Genes *rstR* are presented as found in WGSs which not necessarily properly reflect their real distribution.

Table 2

 Incidence of *ctxB7* *tcpA*^{CIRS} *rtxA4* VSP-II^{A495-512} 4TTTTGAT genotype in clinical *V. cholerae* strains isolated from 2014 to 2018

Year	<i>V. cholerae</i> strains	Country	No.-WHO [□]
2014	CNRVC140176 ^{ERR2265649} , THSTI_41049 ^{ERR2269947} , 41055 ^{ERR2269948} , 41081 ^{ERR2269949}	India	4031/21
2015	IDH08147 ^{SISQ01} , THSTI_45544, _45869, _45983, 46073 ^{ERR2269950-53}	India	889/4
	UG026 ^{PYRH01}	Uganda	1461/33
	7714 ^{MSE001} , OO4 ^{MSEN01} , 1Mo ^{MSEM01} , 39361 ^{MSIV01} (+18)*	Tanzania	11563/144
	31_1 ^{ERR2265589} , 4621STDY6714748, 6714749, 6714750, 6714758 ^{ERS1572783-85,93}	Kenya	13291/67
2016	THSTI_52586, _52588, _52629, _52665 ^{ERR2270655-58}	India	841/3
	CNRVC170168 ^{ERR2265674} , 170170 ^{ERR2265676} , 170173 ^{ERR2265677} , 170174 ^{ERR2265678} , 170175 ^{ERR2269613}	Yemen	15751/164
	UG020 ^{PYRG01}	Uganda	516/11
	4621STDY6714780 ^{ERS1572815}	Kenya	5866/80
2017	THSTI_52712, _55199, _56650, _56695 ^{ERR2270659-62}	India	385/3
	Ogawa OG1 ^{WOF01}	Iraq	NA
	CNRVC170178, 170179 ^{ERR2269616-17} , 170185 ^{ERR2269640} , 170188, 170188 ^{ERR2269643-44} (+5)*	Yemen	1032481/2276
2018	KOL18B3-1 ^{JACAA01} , KOL18B2-2 ^{JACAAE01**}	India	697/0
	NALMLE-03 ^{SIUE01} , -13 ^{SIUO01} , -22 ^{SIUE01} , -30 ^{SIIV01} (+10)*	Bangladesh	566/0
	2018HL24 ^{WSLE01} (imported) ^{□□}	China	NA
	YA00120881 ^{JAAOXH01}	Zimbabwe	10692/65

[□]Numbers of cholera cases/deaths reported to WHO (<https://www.who.int/wer/en/>).

* (Numbers of additional analyzed strains with *rtxA4* from the same outbreaks).

**Strain with 5 TTTTGTAT.

^{□□}Strain from a cholera case imported from India or Nepal [65].

NA – not available.

in a 2011 Indian isolate. The SNPs in the *gyrA* (G248T) and *parC* (C25T) did not appear to be unique for Haitian strains, but seem to be common in Indian isolates identified in the late 1990s and they became conserved in most of the succeeding isolates [4, 51, 52, 56, this study].

Interestingly, in two clinical Moscow isolates, which were imported from India in 2012 and 2014, a previously undescribed *rtxA* allele was detected with a 60 bp deletion in the proximal part of the gene (without any frame shift) and the corresponding deletion of 20 aa (582-601) in the protein (in addition to the absence of 12C-terminal aa due to the premature stop-codon). This new allele, a variant of the previously described *rtxA4* [57], was designated by us *rtxA4a*. Apparently, the new genovariants are gradually continuing to inactivate MARTX in order to conserve energy. The 60 bp deletion in *rtxA4a* is unlikely to affect gene expression, but possibly could have further suppressed biological activity of the protein and thus reduced excess energy costs to the bacterium. The deletion of 20 aa in RtxA4a falls into the region of N-terminal repeats, whose function for *V. cholerae* MARTX is not precisely established. However, similar deletion in MARTX of *V. vulnificus* completely suppressed not only its biological activity, but also translocation of the toxin into eukaryotic cells [62]. Further studies on the structure of *rtxA* gene in the recent isolates of *V. cholerae* and its relationships with virulence will be of much interest.

The *rtxA* genotype *rtxA4a* was identified in one of the two analyzed Indian 2012 isolates (Table 1). Using Blast search in NCBI databases, we have identified *rtxA4a* allele in more recent isolates of *V. cholerae* (2013–2018) not only from India, but also from a number of

Asian and African countries (Table 2). All these isolates belonged to the T13 sublineage of the 7P lineage [56, 63, 64]. This finding suggests that the novel *rtxA4a* allele is an additional attribute of T13 “post-Haitian” outbreak isolates. It is most likely that they were imported from India which has trade and travel connections with many countries listed in Table 2 (<https://oec.world/>). At least, one strain (China, 2018) is known to be isolated from a patient with a recent travel history in Nepal and India [65]. It is still unknown whether such *V. cholerae* strains already reached the Americas, as the Blastn program did not find *rtxA4a* in the available genomes besides those shown in Table 2. However, the Haitian 2011–2012 isolates contained *rtxA4* (Table 1). It should be noted just as, that *ctxB7* allele emerged on the background of *rtxA4*, as the former was never detected in strains with prototype *rtxA1* [57], while our analysis conducted so far has shown that *rtxA4a* most likely appeared on the background of *ctxB7*, because no one strain with *ctxB1* and *rtxA4a* was found. We have analyzed only a few representative isolates from some outbreaks and hence the real proportion of *rtxA4a* in majority of the *V. cholerae* population is not known. Further investigation will reveal its influence in pandemicity or persistence potential of TVC.

Conclusions

Present description of the spread of cholera in India and Russia shows that in spite of different current epidemic situation in two countries, some common traits may be found concerning the risks of the disease upsurge. The emergence of new genotypic variants in

India was rather quickly followed by their migration to Russia, as well as to other countries worldwide, some of which are endemic for cholera. Due to global warming, climatic conditions of certain Russian territories have become warmer, which helps the pathogen in its survival, proliferation and transmission. Russia is also struck by natural disasters which may lead to the shortage of pure water and unsanitary conditions. Though the chances of secondary dissemination of TVC imported to Russia are extremely low owing to the urgent implementation of all the necessary anti-epidemic measures, the influencing factors such as hot weather, heavy rainfalls, plankton blooms, damage of local infrastructure etc., may favor spread of *V. cholerae*. Indisputably, cholera is a global health problem, not only because of its perennial presence in endemic areas, but also its spread in cholera-free countries with well-developed healthcare and anti-epidemic systems. Epidemiological and other control measures are being designed to contribute to the achievement of the goal set by WHO, i.e. total eradication of cholera by 2030 [66]. Molecular studies will promote further progress in certain directions that include checking the persistence of *V. cholerae*, its antimicrobial resistance, development of new diagnostic methods and effective vaccines [10, 67].

Here we used only a restricted set of genetic traits, characteristic of *V. cholerae* El Tor strains isolated in Russia and compared them with those from India and other affected countries while many essential features, such as the presence of additional genomic islands, intact clusters for biofilm formation, sets of housekeeping genes and, especially, the structure of ICE elements, responsible for antibiotic resistance, were not included in our analysis, as this will be the subject of a separate investigation. The markers we selected, while they do allow to distinguish between the representatives of different sublineages, are not adequate in establishing the full picture of the pathogen's evolution. Comparative bioinformatics analysis of WGSs (such as SNP-typing, maximum likelihood phylogeny) is much more discriminative and informative for monitoring of the global spread of the pandemic lineages and hence ought to be carried out with larger number of Russian isolates and compared with Indian and other strains. This review highlights the importance of joint efforts of researchers in India, Russia and in other countries to learn more about the emergent *V. cholerae* strains at the molecular level for the safety of the population in both the countries as well as throughout the world.

References

- Kuleshov K.V., Vodop'yanov S.O., Dedkov V.G., Markelov M.L., Deviatkin A.A., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Mazrukho A.B., Titova S.V., Maleev V.V., Shipulin G.A. Travel-associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(11):2006–8. DOI: 10.3201/eid2211.151727.
- Kuleshov K.V., Kostikova A., Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Tikhonov S.N., Saveliyeva I.V., Saveliyev V.N., Vasilieva O.V., Zinich L.S., Pidchenko N.N., Kulichenko A.N., Shipulin G.A. Comparative genomic analysis of two isolates of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa El Tor isolated during outbreak in Mariupol in 2011. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 44:471–8. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.07.039.
- Onishchenko G.G., Moskvitina E.A., Vodop'yanov A.S., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodop'yanov S.O., Chemisova O.S., Kruglikov V.D., Titova S.V. [Retrospective molecular-epidemiological analysis of cholera epidemic in the Republic of Dagestan in 1994]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (4):33–41. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-33-41.
- Weill F.-X., Domman D., Njamkepo E., Tarr C., Rauzier J., Fawal N., Keddy K.H., Salje H., Moore S., Mukhopadhyay A.K., Bercion R., Luquero F.J., Ngandjio A., Dosso M., Monakhova E., Garin B., Bouchier C., Pazzani C., Mutreja A., Grunow R., Sidikou F., Bonte L., Breurec S., Damian M., Njanpop-Lafourcade B.-M., Sapriel G., Page A.-L., Hamze M., Henkens M., Chowdhury G., Mengel M., Koeck J.-L., Fournier J.-M., Dougan G., Grimont P. A.D., Parkhill J., Holt K.E., Piarroux R., Ramamurthy T., Quilici M.-L., Thomson N.R. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa. *Science*. 2017; 358:785–9. DOI: 10.1126/science.aad5901.
- Greig D.R., Schaefer U., Octavia S., Hunter E., Chattaway M.A., Dallman T.J., Jenkins C. Evaluation of whole-genome sequencing for identification and typing of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56:e00831-18. DOI: 10.1128/JCM.00831-18.
- Patterson K.D. Cholera diffusion in Russia, 1823–1923. *Soc. Sci. Med.* 1994; 38(9):1171–91. DOI: 10.1016/0277-9536(94)90183-x.
- Siddique A.K., Cash R. Cholera outbreaks in the classical biotype era. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 379:1–16. DOI: 10.1007/82_2013_361.
- Mukhopadhyay A.K., Takeda Y., Nair G.B. Cholera outbreaks in the El Tor biotype era and the impact of the new El Tor variants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 379:17–47. DOI: 10.1007/82_2014_363.
- Hu D., Liu B., Feng L., Ding P., Guo X., Wang M., Cao B., Reeves P.R., Wang L. Origins of the current seventh cholera pandemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016; 113(48):E7730–9. DOI: 10.1073/pnas.1608732113.
- Ramamurthy T., Mutreja A., Weill F.-X., Das B., Ghosh A., Nair G.B. Revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of *Vibrio cholerae*. *Front. Public Health.* 2019; 7:203. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00203.
- Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S., Croucher N.J., Choi S.Y., Harris S.R., Lebens M., Niyogi S.K., Kim E.J., Ramamurthy T., Chun J., Wood J.L., Clemens J.D., Czerkinsky C., Nair G.B., Holmgren J., Parkhill J., Dougan G. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*. 2011; 477(7365):462–5. DOI: 10.1038/nature10392.
- Pham T.D., Nguyen T.H., Iwashita H., Takemura T., Morita K., Yamashiro T. Comparative analyses of CTX prophage region of *Vibrio cholerae* seventh pandemic wave 1 strains isolated in Asia. *Microbiol. Immunol.* 2018; 62(10):635–50. DOI: 10.1111/1348-0421.12648.
- Nguyen T.H., Pham T.D., Higa N., Iwashita H., Takemura T., Ohnishi M., Morita K., Yamashiro T. Analysis of *Vibrio* seventh pandemic island II and novel genomic islands in relation to attachment sequences among a wide variety of *Vibrio cholerae* strains. *Microbiol. Immunol.* 2018; 62(3):150–7. DOI: 10.1111/1348-0421.12570.
- Islam M.T., Alam M., Boucher Y. Emergence, ecology and dispersal of the pandemic generating *Vibrio cholerae* lineage. *International Microbiology*. 2017; 20(3):106–15. DOI: 10.2436/20.1501.01.291.
- Smirnova N.I., Cheldyshova N.B., Zadnova S.P., Kutyrev V.V. Molecular-genetic peculiarities of classical biotype *Vibrio cholerae*, the etiologic agent of the last outbreak Asiatic cholera in Russia. *Microb. Pathog.* 2004; 36:131–9. DOI: 10.1016/j.micpath.2003.10.004.
- Narkevich M.I., Onischenko G.G., Lomov J.M., Moskvitina E.A., Podosinnikova L.S., Medinsky G.M. The seventh pandemic of cholera in the USSR, 1961–89. *Bull. World Health Organ.* 1993; 71:189–96. (Cited 10 Sept 2020). [Internet]. Available from: <https://www.questia.com/library/journal/1G1-13913981/the-seventh-pandemic-of-cholera-in-the-ussr-1961-89>.
- Onishchenko G.G., Moskvitina E.A., Kruglikov V.D., Titova S.V., Adamenko O.L., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O. [Epidemiological surveillance of cholera in Russia during the period of the seventh pandemic]. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk [Annals of the Russian Academy of Medical Sciences]*. 2015; 70(2):249–56. DOI: 10.15690/vramn.v70i2.1320.
- Pisanov R., Ezhova M., Monakhova E., Cherkasov A., Krasnov Y., Vodop'yanov A., Kul'shan' T., Livanova L., Portenko S., Abdrashitova A., Kruglikov V., Titova S. [Peculiarities of genome structure of toxigenic *Vibrio cholerae* El Tor Inaba strain, isolated from a surface water body in the territory of Rostov-on-Don in 2014]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (2):63–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-63-67.
- Emch M., Feldacker C., Islam M.S., Ali M. Seasonality of cholera from 1974 to 2005: a review of global patterns. *Int. J. Health. Geogr.* 2008; 7:31. DOI: 10.1186/1476-072X-7-31.

20. WHO. 517 Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, October 2009 – conclusions and recommendations. *Wkly Epidemiol. Rep.* 2009; 84:517–32. Available from: <https://www.who.int/wer/2009/wer8450/en>.
21. Sarkar B.L., Kanungo S., Nair G.B. How endemic is cholera in India? *Indian. J. Med. Res.* 2012; 135:246–8. PMID: PMC3336858.
22. Kanungo S., Sah B.K., Lopez A.L., Sung J.S., Paisley A.M., Sur D., Clemens J.D., Nair G.B. Cholera in India: an analysis of reports, 1997–2006. *Bull. World Health Organ.* 2010; 88(3):185–91. DOI: 10.2471/BLT.09.073460.
23. Ali M., Gupta S.S., Arora N., Khasnobis P., Venkatesh S., Sur D., Nair G.B., Sack D.A., Ganguly N.K. Identification of burden hotspots and risk factors for cholera in India: an observational study. *PLoS One.* 2017; 12(8):e0183100. DOI: 10.1371/journal.pone.0183100.
24. Mironova L.V., Gladkikh A.S., Ponomareva A.S., Feranchuk S.I., Bochalgin N.O., Basov E.A., Khunkheeva Z.Yu., Balakhonov S.V. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated at epidemic complications in Siberia and at the Far East. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 60:80–8. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.02.023.
25. Liashko V. Cholera outbreak in Donetsk Oblast, Ukraine, in 2011. *EpiNorth Journal of the Network for Communicable Disease Control in Northern and Eastern Europe.* 2012; 13:117–20. [Internet]. Available from: <https://docplayer.ru/55732270-No-3-vol-journal-of-the-network-for-communicable-disease-control-in-northern-and-eastern-europe.html>.
26. Domashenko O.N., Belomerya T.A., Martynova N.V., Daragan G.N., Demkovich O.O., Malakhova U.V., Zemlyanskaya G.I., Popova D.M. [Cholera in Azov area]. *Zhurnal infektsologii [Journal Infectology]*. 2015; 7(2):92–7. DOI: 10.22625/2072-6732-2015-7-2-92-97.
27. Kul'shan' T.A., Krasnov Y.M., Lozovsky Y.V., Smirnova N.I. Molecular MLVA typing of typical and genetically altered natural strains of *Vibrio cholerae* El Tor biovar. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2012; 4(114):39–43. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-4-39-43.
28. Balakhonov S.V., Mironova L.V., Basov E.A., Gladkikh A.S., Afanasev M.V., Ganin V.S., Urbanovich L.Y., Sidorova E.A. Whole-genome sequencing of a *Vibrio cholerae* El Tor strain isolated in the imported cholera focus in Siberia. *Genome Announc.* 2015; 3(2):e01550-14. DOI: 10.1128/genomeA.01550-14.
29. Didelot X., Pang B., Zhou Z., McCann A., Ni P., Li D., Achtman M., Kan B. The role of China in the global spread of the current cholera pandemic. *PLoS Genet.* 2015; 11(3):e1005072. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005072.
30. Almagro-Moreno S., Taylor R.K. Cholera: environmental reservoirs and impact on disease transmission. *Microbiol. Spectr.* 2013; 1(2):OH-0003-2012. DOI: 10.1128/microbiolspec.OH-0003-2012.
31. Lutz C., Erken M., Noorin P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 2013; 4:375. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375.
32. Conner J.G., Teschler J.K., Jones C.J., Yildiz F.H. Staying alive: *Vibrio cholerae*'s cycle of environmental survival, transmission, and dissemination. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(2):10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015.
33. Mavian C., Paisie T.K., Alam M.T., Browne C., Beau De Rochars V.M., Nembrini S., Cash M.N., Nelson E.J., Azarian T., Ali A., Morris J.G. Jr, Salemi M. Toxigenic *Vibrio cholerae* evolution and establishment of reservoirs in aquatic ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020; 117(14):7897–904. DOI: 10.1073/pnas.1918763117.
34. Batabyal P., Mookerjee S., Palit A. Occurrence of toxigenic *Vibrio cholerae* in accessible water sources of cholera endemic foci in India. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2012; 65(4):358–60. DOI: 10.7883/yoken.65.358.
35. Mishra A., Taneja N., Sharma M. Environmental and epidemiological surveillance of *Vibrio cholerae* in a cholera-endemic region in India with freshwater environs. *J. Appl. Microbiol.* 2012; 112(1):225–37. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05191.x.
36. Taneja N., Mishra A., Batra N., Gupta P., Mahindroo J., Mohan B. Inland cholera in freshwater environs of north India. *Vaccine.* 2019; 38(Suppl. 1):A63–A72. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.038.
37. Maramovich A.S., Urbanovich L.Ya., Kulikalova E.S., Shkaruba T.T. [The role and purpose of surface water bodies in the establishment and development of the VII cholera pandemic]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2009; (2):21–5.
38. Titova S.V., Monakhova E.V., Alekseeva L.P., Pisanov R.V. [Molecular genetic basis of biofilm formation as a component of *Vibrio cholerae* persistence in water reservoirs of Russian Federation]. *Ekologicheskaya Genetika [Ecological genetics]*. 2018; 16(4):23–32. DOI: 10.17816/ecogen16423-32.
39. Alam M.T., Weppelmann T.A., Longini I., DeRochars V.M.B., Morris J.G., Jr, Ali A. Increased isolation frequency of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 from environmental monitoring sites in Haiti. *PLoS One.* 2015; 10(4):e0124098. DOI:10.1371/journal.pone.0124098.
40. Baron S., Lesne J., Moore S., Rossignol E., Rebaudet S., Gazin P., Barraix R., Magloire R., Boncy J., Piarroux R. No evidence of significant levels of toxigenic *V. cholerae* O1 in the Haitian aquatic environment during the 2012 rainy season. *PLoS Curr.* 2013; 5:ecurrents.outbreaks.7735b392bdc749baf5812d2096d331e. DOI: 10.1371/currents.outbreaks.7735b392bdc749baf5812d2096d331e.
41. Rebaudet S., Moore S., Rossignol E., Bogreau H., Gaudart J., Normand A.C., Laraque M.J., Adrien P., Boncy J., Piarroux R. Epidemiological and molecular forensics of cholera recurrence in Haiti. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):1164. DOI: 10.1038/s41598-018-37706-0.
42. Moore S., Thomson N., Mutreja A., Piarroux R. Widespread epidemic cholera caused by a restricted subset of *Vibrio cholerae* clones. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20(5):373–9. DOI: 10.1111/1469-0691.12610.
43. Deen J., Mengel M.A., Clemens J.D. Epidemiology of cholera. *Vaccine.* 2020; 38(Suppl. 1):A31–A40. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.078.
44. Antonova E.S., Hammer B.K. Quorum-sensing autoinducer molecules produced by members of a multispecies biofilm promote horizontal gene transfer to *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2011; 322(1):68–76. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02328.x.
45. Chawdhury F.R., Nur Z., Hassan N., von Seidlein L., Dunachie S. Pandemics, pathogenicity and changing molecular epidemiology of cholera in the era of global warming. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2017; 16(1):10. DOI: 10.1186/s12941-017-0185-1.
46. Lekshmi N., Joseph I., Ramamurthy T., Thomas S. Changing facades of *Vibrio cholerae*: An enigma in the epidemiology of cholera. *Indian J. Med. Res.* 2018; 147(2):133–41. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR.280.17.
47. Gupta S.S., Ganguly N.K. Opportunities and challenges for cholera control in India. *Vaccine.* 2020; 38(Suppl. 1):A25–A27. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.032.
48. Hu D., Yin Z., Yuan C., Yang P., Qian C., Wei Y., Zhang S., Wang Y., Yuan J., Wang M., Reeves P.R., Tu L., Chen M., Huang D., Liu B. Changing molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* outbreaks in Shanghai, China. *mSystems.* 2019; 4(6):e00561-19. DOI: ms.00561-19.
49. Pal B.B., Khuntia H.K., Nayak S.R., Mohanty A., Biswal B. *Vibrio cholerae* O1 Ogawa strains carrying the ctxB7 allele caused a large cholera outbreak during 2014 in the tribal areas of Odisha, India. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2017; 70(5):549–53. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2016.585.
50. Zadnova S.P., Kul'shan' T.A., Cheldyshova N.B., Kritsky A.A., Plekhanov N.A., Smirnova N.I. Comparative analysis of survival capacity among typical and nonvariant strains of *Vibrio cholerae*, biovar El Tor in vivo and in vitro. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; 4(6):5–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-6-5-9.
51. Hasan N.A., Choi S.Y., Eppinger M., Clark P.W., Chen A., Alam M., Haley B.J., Taviani E., Hine E., Su Q., Tallon L.J., Prosper J.B., Furth K., Hoq M.M., Li H., Fraser-Liggett C.M., Cravioto A., Huq A., Ravel J., Cebula T.A., Colwell R.R. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(29):E2010-7. DOI: 10.1073/pnas.1207359109.
52. Ghosh P., Naha A., Pazhani G.P., Ramamurthy T., Mukhopadhyay A.K. Genetic traits of *Vibrio cholerae* O1 Haitian isolates that are absent in contemporary strains from Kolkata, India. *PLoS One.* 2014; 9(11):e112973. DOI: 10.1371/journal.pone.0112973.
53. Ghosh P., Kumar D., Chowdhury G., Singh P., Samanta P., Dutta S., Ramamurthy T., Sharma N.C., Sinha P., Prasad Y., Shinoda S., Mukhopadhyay A.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains that trace the origin of Haitian-like genetic traits. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 54:47–53. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.06.015.
54. Ha S.-M., Chalita M., Yang S.-J., Yoon S.-H., Cho K., Seong W.K., Hong S., Kim J., Kwak H.-S., Chun J. Comparative genomic analysis of the 2016 *Vibrio cholerae* outbreak in South Korea. *Front. Public Health.* 2019; 7:228. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00228.
55. Rashid M.-U., Rashed S.M., Islam T., Johura F.T., Watanabe H., Ohnishi M., Alam M. CtxB1 outcompetes CtxB7 in *Vibrio cholerae* O1, Bangladesh. *J. Med. Microbiol.* 2016; 65(1):101–3. DOI: 10.1099/jmm.0.000190.
56. Weill F.-X., Domman D., Njamkepo E., Almesbahi A.A., Naji M., Nasser S.S., Rakesh A., Assiri A.M., Sharma N.C., Kariuki S., Pourshafie M.R., Raoult J., Abubakar A., Carter J.Y., Wamala J.F., Seguin C., Bouchier C., Malliavin T., Bakhshi B., Abulmaali H.H.N., Kumar D., Njoroge S.M., Malik M.R., Kiiru J., Luquero F.J., Azman A.S., Ramamurthy T., Thomson N.R., Quilici M.-L. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature.* 2019; 565(7738):230–3. DOI: 10.1038/s41586-018-0818-3.
57. Dolores J., Satchell K.J.F. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique *rtxA* variants in environmental strains and an *rtxA* null-mutation in recent altered El Tor isolates.

mBio. 2013; 4(2):e00624-12. DOI: 10.1128/mBio.00624-12.

58. Das M.M., Bhotra T., Zala D., Singh D.V. Phenotypic and genetic characteristics of *Vibrio cholerae* O1 carrying Haitian *ctxB* and attributes of classical and El Tor biotypes isolated from Silvassa, India. *J. Med. Microbiol.* 2016; 65(8):720–8. DOI: 10.1099/jmm.0.000282.

59. Naha A., Mandal R.S., Samanta P., Saha R.N., Shaw S., Ghosh A., Chatterjee N.S., Dutta P., Okamoto K., Dutta S., Mukhopadhyay A.K. Deciphering the possible role of *ctxB7* allele on higher production of cholera toxin by Haitian variant *Vibrio cholerae* O1. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(4):e0008128. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008128.

60. Kuleshov K.V., Vodop'ianov S.O., Dedkov V.G., Markelov M.L., Kermanov A.V., Kruglikov V.D., Vodop'ianov A.S., Pisanov R.V., Chemisova O.S., Mazrukho A.B., Titova S.V., Shipulin G.A. Draft genome sequencing of *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates collected in the Russian Federation from imported cholera cases. *Genome Announc.* 2014; 2(4):e00624-14. DOI: 10.1128/genomeA.00624-14.

61. Smirnova N.I., Krasnov Y.M., Agafonova E.Y., Shchelkanova E.Y., Alkhova Z.V., Kutyrev V.V. Whole-genome sequencing of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Ukraine (2011) and Russia (2014). *Genome Announc.* 2017; 5(8):e01640-16. DOI: 10.1128/genomeA.01640-16.

62. Katz L.S., Petkau A., Beaulaurier J., Tyler S., Antonova E.S., Turnsek M.A., Guo Y., Wang S., Paxinos E.E., Orata F., Gladney L.M., Stroika S., Folster J.P., Rowe L., Freeman M.M., Knox N., Kim B.S., Gavin H.E., Satchell K.J. Distinct roles of the repeat-containing regions and effector domains of the *Vibrio vulnificus* multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) toxin. *mBio*. 2015; 6(2):e00324-15. DOI: 10.1128/mBio.00324-15.

63. Bwire G., Sack D.A., Almeida M., Li S., Voeglein J.B., Debes A.K., Kagirita A., Buyinza A.W., Orach C.G., Stine O.C. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* responsible for cholera epidemics in Uganda by PCR, MLVA and WGS. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(6):e0006492. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006492.

64. Houmnanou Y.M.G., Leekitcharoenphon P., Kudirkiene E., Mdegela R.H., Hendriksen R.S., Olsen J.E., Dalsgaard A. Genomic insights into *Vibrio cholerae* O1 responsible for cholera epidemics in Tanzania between 1993 and 2017. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019; 13(12):e0007934. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007934.

65. Li F., Pang B., Yan H., Lu X., Li J., Zhou H., Cui Z., Zhao L., Mahemut, Huo D., Kan B., Jia L. Investigation of an imported cholera case in China with whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 84:104362. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104362.

66. WHO. Global Task Force on Cholera Control. Ending Cholera. A Global Roadmap to 2030. 2017; 32 p. (Cited 18 June 2020). [Internet]. Available from: <http://www.who.int/cholera/publications/global-roadmap.pdf>.

67. Mutreja A., Dougan G. Molecular epidemiology and inter-continental spread of cholera. *Vaccine*. 2020; 38(Suppl. 1):A46–A51. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.038.

Authors:

Monakhova E.V. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: monakhova_ev@antiplague.ru.

Ghosh A., J.C. Bose Chair Professor of the NASI, India. ICMR-National Institute of Cholera and Enteric Diseases. P-33, CIT Scheme XM, Beliaghata, Kolkata - 700 010, India. E-mail: amitghosh24@yahoo.com.

Mutreja A. Department of Medicine, University of Cambridge. Level 5, Addenbrookes Hospital, Cambridge CB2 0QQ, United Kingdom. E-mail: am872@medschl.cam.ac.uk.

Weill F.-X. Institut Pasteur, Unité des bactéries pathogènes entériques. 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France. E-mail: francois-xavier.weill@pasteur.fr.

Ramamurthy T., INSA-Senior Scientist. ICMR-National Institute of Cholera and Enteric Diseases. P-33, CIT Scheme XM, Beliaghata, Kolkata - 700 010, India. E-mail: ramalmurthy@yahoo.com.

Об авторах:

Монахова Е.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: monakhova_ev@antiplague.ru.

Ghosh A., J.C. Bose Chair Professor of the NASI, India. ICMR-National Institute of Cholera and Enteric Diseases. P-33, CIT Scheme XM, Beliaghata, Kolkata - 700 010, India. E-mail: amitghosh24@yahoo.com.

Mutreja A. Department of Medicine, University of Cambridge. Level 5, Addenbrookes Hospital, Cambridge CB2 0QQ, United Kingdom. E-mail: am872@medschl.cam.ac.uk.

Weill F.-X. Institut Pasteur, Unité des bactéries pathogènes entériques. 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France. E-mail: francois-xavier.weill@pasteur.fr.

Ramamurthy T., INSA-Senior Scientist. ICMR-National Institute of Cholera and Enteric Diseases. P-33, CIT Scheme XM, Beliaghata, Kolkata - 700 010, India. E-mail: ramalmurthy@yahoo.com.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-27-35

УДК 616.98:578.2

В.Г. Акимкин¹, С.Н. Кузин¹, Т.А. Семенов², А.А. Плоскирева¹, Д.В. Дубоделов¹, Е.В. Тиванова¹,
Н.Ю. Пшеничная¹, А.В. Каленская¹, С.Б. Яцышина¹, О.Ю. Шипулина¹, Е.Н. Родионова¹,
Н.С. Петрова¹, И.В. Соловьева¹, О.А. Квасова¹, М.А. Вершинина¹, М.В. Мамошина¹, В.В. Клущкина¹,
Н.С. Чурилова¹, Я.В. Панасюк¹, Н.В. Власенко¹, А.А. Остроушко¹, Е.С. Балмасов¹, А.В. Мосунов¹

ГЕНДЕРНО-ВОЗРАСТНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ЭПИДЕМИИ В МОСКВЕ

¹ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», Москва, Российская Федерация;

²ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Российская Федерация

Продолжающаяся пандемия COVID-19 в мире и в России остается главным событием 2020 г. Во всем мире проводятся исследования по всестороннему изучению закономерностей и проявлений эпидемического процесса COVID-19. Для разработки системы эпидемиологического надзора важное значение имеют основные количественные характеристики динамики распространения SARS-CoV-2 в популяции, основанные на материалах официального мониторинга за текущей ситуацией. **Цель** исследования – изучение особенностей гендерно-возрастной структуры пациентов с COVID-19 в Москве. **Материалы и методы.** Проведен ретроспективный эпидемиологический анализ данных по изучению гендерно-возрастной структуры заболевших COVID-19 в период с 6 марта по 6 июля 2020 г. в различные фазы развития эпидемии в Москве. **Результаты и обсуждение.** Средний возраст заболевших COVID-19 в Москве за изучаемый период составил $46,41 \pm 20,58$ года. Гендерная пропорция среди заболевших COVID-19 в Москве составляла 52,7/47,3 %, при этом показатели варьировали в зависимости от возраста. Соотношение мужчины/женщины в возрастной группе «до 39 лет» составляло 53,7/46,3 %, а у пациентов старше 40 лет – 39,3/60,7 %. В группе мужчин, заболевших COVID-19, преобладали пациенты в возрасте 19–39 лет (35,4 %), тогда как среди женщин – больные в возрасте 40–59 лет (36,5 %). Возрастная структура пациентов в Москве указывает на то, что COVID-19 является заболеванием, в первую очередь, лиц старших возрастных групп. Возрастная структура всех заболевших COVID-19 за период наблюдения характеризуется преобладанием взрослых пациентов старше 19 лет – 92,7 % (92,6–92,8 %), в том числе доля пациентов в возрасте 40–59 лет составляет 35,7 % (35,5–35,9 %). Показаны различия в возрастной структуре мужчин и женщин с COVID-19: среди мужчин наиболее высокий удельный вес у пациентов двух возрастных групп: «19–39 лет» и «40–59 лет» – 35,4 % (35,1–35,7 %) и 34,9 % (34,6–35,2 %), среди женщин преобладали пациентки 40–59 лет – 36,5 % (36,3–36,8 %).

Ключевые слова: COVID-19, гендерно-возрастная структура, эпидемический процесс, система эпидемиологического надзора, SARS-CoV-2.

Корреспондирующий автор: Кузин Станислав Николаевич, e-mail: drkuzin@list.ru.

Для цитирования: Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А., Плоскирева А.А., Дубоделов Д.В., Тиванова Е.В., Пшеничная Н.Ю., Каленская А.В., Яцышина С.Б., Шипулина О.Ю., Родионова Е.Н., Петрова Н.С., Соловьева И.В., Квасова О.А., Вершинина М.А., Мамошина М.В., Клущкина В.В., Чурилова Н.С., Панасюк Я.В., Власенко Н.В., Остроушко А.А., Балмасов Е.С., Мосунов А.В. Гендерно-возрастная характеристика пациентов с COVID-19 на разных этапах эпидемии в Москве. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:27–35. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-27-35

Поступила 23.09.20. Принята к публ. 24.09.20.

V.G. Akimkin¹, S.N. Kuzin¹, T.A. Semenenko², A.A. Ploskireva¹, D.V. Dubodelov¹, E.V. Tivanova¹,
N.Yu. Pshenichnaya¹, A.V. Kalenskaya¹, S.B. Yatsyshina¹, O.Yu. Shipulina¹, E.N. Rodionova¹,
N.S. Petrova¹, I.V. Solov'eva¹, O.A. Kvasova¹, M.A. Vershinina¹, M.V. Mamoshina¹, V.V. Klushkina¹,
N.S. Churilova¹, Ya.V. Panasyuk¹, N.V. Vlasenko¹, A.A. Ostroushko¹, E.S. Balmasov¹, A.V. Mosunov¹

Gender-Age Distribution of Patients with COVID-19 at Different Stages of Epidemic in Moscow

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

²N.F. Gamalei National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The ongoing COVID-19 pandemic around the world and in Russia remains a major event of 2020. All over the world, research is being conducted to comprehensively study the patterns and manifestations of the epidemic process. The main quantitative characteristics of SARS-CoV-2 transmission dynamics among the population, based on the data of official monitoring over the current situation, play an important role in the development of the epidemiological surveillance system. **The aim** of this study is to explore the peculiarities of age-gender distribution of COVID-19 patients in Moscow. **Material and methods.** The data related to the epidemiological characteristics of age-gender structure of COVID-19 patients in Moscow between March 19, 2020 and April 15, 2020, at different stages of the epidemic were retrospectively analyzed. **Results and discussion.** The mean age of COVID-19 patients in Moscow was $46,41 \pm 20,58$ years. The gender ratio (male/female) among the patients was 52.7/47.3 %, wherein the indicators varied depending upon

the age. Male/female ratio in the age group “under 39” stood at 53.7/46.3 %, and “over 40 years of age” – at 39.3/60.7 %. The predominant age range among male cases was 19 to 39 years old – 35.4 %, while among female patients – 40–59 years (36.5 %). The age distribution of patients in Moscow is indicative of the fact that COVID-19 is a disease that primarily affects older age groups. The age structure of all COVID-19 cases during the observation period is characterized by predominance of adult patients over 19 years of age – 92,7 % (92,6–92,8 %), the share of patients aged 40–59 years is 35,7% (35,5–35,9 %). The differences in the age distribution in males and females are as follows: in the male cohort, the age groups 19–39 years old and 40–59 years old prevail – 35.4 % (35.1–35.7 %) and 34.9 % (34.6–35.2 %), respectively. The age group 40–59 years old – 36.5 % (36.3–36.8%) dominates in the female cohort.

Key words: COVID-19, age-gender distribution, epidemic process, epidemiological surveillance system, SARS-CoV-2.

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

Corresponding author: Stanislav N. Kuzin, e-mail: drkuzin@list.ru.

Citation: Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenenko T.A., Ploskireva A.A., Dubodelov D.V., Tivanova E.V., Pshenichnaya N.Yu., Kalenskaya A.V., Yatsyshina S.B., Shipulina O.Yu., Rodionova E.N., Petrova N.S., Solov'eva I.V., Kvasova O.A., Vershinina M.A., Mamoshina M.V., Klushkina V.V., Churilova N.S., Panasyuk Ya.V., Vlasenko N.V., Ostroushko A.A., Balmasov E.S., Mosunov A.V. Gender-Age Distribution of Patients with COVID-19 at Different Stages of Epidemic in Moscow. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:27–35. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-27-35

Received 23.09.20. Accepted 24.09.20.

Akimkin V.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>
Kuzin S.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0616-9777>
Semenenko T.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>
Ploskireva A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3612-1889>
Dubodelov D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3093-573>
Tivanova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1286-2612>
Pshenichnaya N.Yu., ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2570-711X>
Kalenskaya A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9126-1155>
Yatsyshina S.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4737-941X>
Shipulina O.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4679-6772>
Rodionova E.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0192-1832>
Petrova N.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0166-555X>

Solov'eva I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3136-9500>
Kvasova O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4545-1804>
Vershinina M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8582-5199>
Mamoshina M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1419-7807>
Klushkina V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8311-8204>
Churilova N.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5344-5829>
Panasyuk Ya.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9335-4953>
Vlasenko N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2388-1483>
Ostroushko A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0803-5630>
Balmasov E.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3382-2441>
Mosunov A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6743-3650>

Впервые за последнее время мировая медицина столкнулась с глобальной угрозой здоровью человека в связи с появлением респираторной инфекции, вызванной новым коронавирусом SARS-CoV-2, которой Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) 11 февраля 2020 г. присвоила официальное название COVID-19. Учитывая масштаб угрозы, национальные системы здравоохранения всех стран мира, включая Россию, поставили перед специалистами задачу взять под контроль распространение вируса. В настоящее время проводятся исследования, касающиеся различных направлений противодействия инфекции, таких как разработка методов диагностики, профилактики, лечения и т.д. Одним из важных аспектов борьбы с COVID-19 является изучение закономерностей, присущих эпидемическому процессу данной инфекции, и разработка системы эпидемиологического надзора за распространением SARS-CoV-2 на основе полученной информации.

Одним из приоритетов в настоящее время является определение целевых групп населения, в отношении которых наиболее высок риск инфицирования, а также параметров мониторинга, которые обеспечат информационную достаточность для принятия адресных и эффективных управленческих решений. Особую актуальность исследованиям по проблеме COVID-19 придает то, что это первое попадание SARS-CoV-2 в популяцию людей и сейчас только начинается его изучение.

В России эпидемия COVID-19 началась несколько позднее, чем в большинстве стран мира, что дало возможность подготовить медицинскую инфраструктуру и, с учетом имеющихся данных по другим странам, принять необходимые превентивные меры. По данным зарубежных авторов, известно, что мужчи-

ны болеют более тяжело, чем женщины, серьезными факторами риска являются возраст пациента старше 60 лет, ожирение, диабет, сердечно-сосудистая недостаточность и др., но при этом можно отметить некоторую вариативность информации о закономерностях распространения SARS-CoV-2, что обусловлено множеством факторов [1–4]. Очевидна необходимость проведения собственных эпидемиологических исследований с учетом многообразия климато-географических и социально-демографических условий регионов Российской Федерации.

Цель работы: изучение особенностей гендерного состава и возрастной структуры пациентов с COVID-19 в Москве.

Материалы и методы

Исследование выполнено в ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Проведен ретроспективный эпидемиологический анализ случаев с подтвержденной новой респираторной инфекцией COVID-19 в разные периоды развития эпидемии в Москве (с 6 марта по 6 июля 2020 г.) в порядке мониторинга эпидемиологической ситуации. Информация о пациентах (возраст, пол) извлечена из базы данных, сформированной на основе материалов формы статистического учета № 058/у «Экстренное извещение об инфекционном, паразитарном и другом заболевании, профессиональном отравлении, неблагоприятной реакции, связанной с иммунизацией, воздействии живых механических сил».

Для проведения анализа в когорте пациентов (N=224613) выделены следующие возрастные группы: «0–18», «19–39», «40–59», «60–79» и «старше 80 лет». Возрастная группа детей определена в соответ-

ствии с положением Международной конвенции защиты прав ребенка, принятой в России, согласно которой к детям относятся «человеческие индивидуумы в возрасте от рождения до 18 лет» [5]. Исследуемые показатели анализировали как за весь период, так и за четыре временных отрезка, соответствующих отдельным фазам развития эпидемии в Москве: период «завоза» (с 6 по 24 марта 2020 г.); период роста заболеваемости (с 25 марта по 1 мая 2020 г.); период стабильно высокого уровня заболеваемости (со 2 по 15 мая 2020 г.); период умеренного снижения заболеваемости (с 16 мая по 6 июля 2020 г.).

Показатели описательной статистики рассчитаны с использованием пакета анализа программы MS Excel. Величины биномиальных доверительных интервалов для средних значений частоты обнаружения РНК SARS-CoV-2 рассчитывали «точным методом» Клоппера – Пирсона. Динамику анализируемых показателей определяли с помощью расчета величины тенденции методом наименьших квадратов. Выраженность тенденций (рост/снижение) оценивали по критериям, предложенным В.Д. Беляковым и соавт. [6].

Результаты и обсуждение

В течение периода наблюдения с 6 марта по 6 июля 2020 г. в Москве зарегистрированы 224613 случаев COVID-19. Среди заболевших несколько преобладали женщины – 52,7 % (52,5–52,9 %)¹, тогда как мужчины заболевали в 47,3 % (47,1–47,6 %) случаев. Средний возраст заболевших COVID-19 в Москве за изучаемый период составил (46,41±20,58) года. Средний возраст мужчин и женщин с COVID-19 несколько различался – (44,0±21,9) и (48,2±24,7) года соответственно. Следует отметить, что столь существенная величина стандартного отклонения свидетельствует о значительной вариативности возраста пациентов. Пациенты с COVID-19 характеризовались доминированием лиц преимущественно среднего и пожилого возраста (рис. 1).

Наиболее часто COVID-19 регистрировали у лиц возрастных групп «40–59 лет» и «19–39 лет» – 35,7 % (35,5–35,9 %) и 30,8 % (30,6–31,0 %) соответственно. В целом же пациенты старше 19 лет составили 92,7 % (92,6–92,8 %) от общей численности лиц, заболевших COVID-19 в Москве. Можно констатировать, что в условиях мегаполиса при действующем режиме самоизоляции и социального дистанцирования наиболее вовлеченным в эпидемический процесс COVID-19 является трудоспособное взрослое население в возрасте 19–59 лет, которое обеспечивает необходимую деятельность городского хозяйства. Удельный вес этой категории граждан среди всех заболевших суммарно составил 66,7 % (66,5–66,9 %). Также значительный удельный вес имели пациенты в возрасте 60–79 лет – 20,2 % (20,0–20,4 %). Эта воз-

растная группа представлена пенсионерами (65 лет и старше), в том числе работающими, для которых с 28 марта 2020 г. введен режим домашней самоизоляции, что существенно снизило распространение SARS-CoV-2.

Дети также были вовлечены в эпидемический процесс COVID-19 на всех этапах эпидемии, но значительно менее интенсивно. Так, удельный вес детей до 5 лет и 6–18 лет за весь период наблюдения составил 2,5 % (2,4–2,6 %) и 4,9 % (4,7–4,9 %) соответственно. Важно отметить, что режим самоизоляции, который продолжался до 09.06.2020 г., не обеспечил абсолютную безопасность, и заражение детей SARS-CoV-2 осуществлялось в семье, посредством контакта с инфицированным родственником. Вторичные случаи заражения в семейных очагах обусловлены наличием бессимптомных форм COVID-19 и невозможностью проводить скрининг всего населения с периодичностью в 2 недели (продолжительность инкубационного периода). По данным Е.Р. Мескиной [7], именно посредством внутрисемейной передачи осуществилось вовлечение детей в эпидемический процесс, коэффициент очаговости составил 82,8 %.

Обращают на себя внимание различия в соотношении мужчин и женщин с COVID-19 различных возрастных групп. Среди пациентов до 39 лет преобладали мужчины, тогда как от 40 лет и старше – женщины. Гендерная пропорция в возрастной группе до 39 лет составляла 53,7 % (53,3–54,0 %) / 46,3 % (46,0–46,7 %). У пациентов старше 40 лет соотношение мужчины/женщины было более выраженным – 39,3 % (39,1–39,6 %) / 60,7 % (60,4–61,0 %).

Разделение пациентов с COVID-19 по гендерному признаку позволило выявить ряд закономерностей (рис. 2).

Изучение возрастного распределения случаев COVID-19 отдельно у мужчин и женщин показало, что среди мужчин наиболее высокий и при этом сходный удельный вес заболевших отмечен в двух возрастных группах: «19–39 лет» и «40–59 лет» – 35,4 % (35,1–35,7 %) и 34,9 % (34,6–35,2 %) соот-

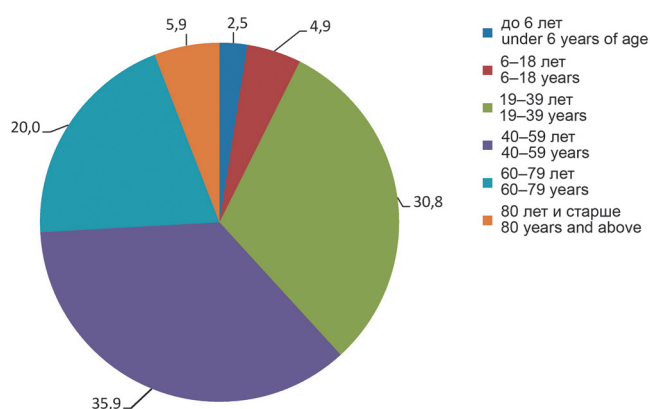


Рис. 1. Удельный вес пациентов с COVID-19 различных возрастных групп в период с 6 марта по 6 июля 2020 г. в Москве

Fig. 1. Percentage of COVID-19 patients among different age groups during the period of March 06, 2020 to July 06, 2020 in Moscow

¹Здесь и далее в скобках приведен 95 % доверительный интервал.

ветственно. Среди женщин преобладали пациентки 40–59 лет, чей удельный вес составил 36,5 % (36,3–36,8 %). Удельный вес пациенток в возрасте 19–39 лет составил 26,9 % (26,6–27,1 %). Так же высока доля женщин 60–79 лет – 22,2 % (22,0–22,5 %). Различия выявлены в удельном весе объединенной группы детей от 0 до 18 лет: в мужской группе с COVID-19 дети составляли 8,1 % (7,9–8,2 %), тогда как в женской – 6,7 % (6,5–6,8 %).

Анализ возрастной структуры заболевших COVID-19 в сравниваемых группах (мужчин и женщины) позволил выявить некоторые отличия в период завоза, относительно других периодов развития эпидемии в Москве. Период с 6 по 24 марта 2020 г. (20 дней) характеризовался возвращением туристов из стран, в которых к этому моменту уже длительное время развивалась эпидемия COVID-19, причем ситуация была весьма напряженной и во многих странах действовал жесткий режим самоизоляции. Неслучайно первый пациент в Москве – турист, прибывший из Италии. Именно в это время (11 марта) ВОЗ объявила о пандемии коронавирусной инфекции. В начале периода завоза регистрировали немногочисленные случаи COVID-19 у туристов и командированных специалистов, возвращающихся из разных стран мира. Очевидно, что не все случаи заболеваний могли быть выявлены, что предопределило дальнейшее распространение вируса, главным образом в семейном окружении инфицированных. В результате начавшегося распространения SARS-CoV-2 к концу периода завоза число ежедневно выявляемых заболевших возросло, 22 марта 2020 г. зарегистрировано 54 новых случая COVID-19, а 23 марта 2020 г. – 71. Есть основания утверждать, что в этот временной интервал в Москве SARS-CoV-2 начал выходить в популяцию с возрастающей интенсивностью, что создало предпосылки для эпидемического распространения. В общей сложности за первые 20 дней с начала эпидемии в Москве зарегистрирован 441 случай COVID-19.

Возрастная структура заболевших COVID-19 в этот период характеризовалась преобладанием па-

циентов в возрасте 19–39 лет – 49,3 % (42,5–56,1 %) у мужчин и 57,2 % (50,4–63,8 %) у женщин (таблица). Удельный вес возрастной группы «40–59 лет» также был высоким: у мужчин – 32,0 % (25,8–38,6 %), у женщин – 23,4 % (18,0–29,6 %). Остальные группы пациентов в возрастной структуре заболевших COVID-19 в этот период имели значительно меньший удельный вес. Так, мужчины и женщины 60–79 лет составляли 10,4 % (6,7–15,1 %) и 8,7 % (5,3–13,2 %).

В период роста заболеваемости (с 25 марта по 1 мая 2020 г.) эпидемический процесс COVID-19 интенсифицировался, распространение SARS-CoV-2 приобрело характер эпидемии. Если в первые дни этого периода регистрировали не более 150 новых случаев COVID-19, то в его завершающий день – 3561. Темп роста в этот период составил +6,2 % в день (выраженный рост). Возрастная структура сравниваемых групп пациентов (мужчины и женщины) в период роста отличалась от периода завоза. Среди мужчин доля пациентов в возрасте 19–39 лет стала меньше – 37,5 % (36,9–38,0 %), оставаясь самой высокой. Удельный вес пациентов возрастных групп «40–59 лет» и «60–79 лет», по сравнению с периодом завоза, составил 36,2 % (35,6–36,7 %) и 16,5 % (16,1–16,9 %) соответственно. У женщин с COVID-19 в период роста максимальный удельный вес зафиксирован в группе «40–59 лет» – 39,0 % (38,5–39,6 %) и существенно ниже в группе «19–39 лет» – 25,9 % (25,4–26,4 %). Пациенты этих возрастных групп наиболее активно вовлечены в эпидемический процесс. Доля пациентов остальных возрастных групп, как и в период завоза, была невелика (таблица).

В период стабильно высокого уровня заболеваемости (2–15 мая 2020 г.) ежедневно выявляли от 4703 до 6703 новых случаев COVID-19. В последние 4 дня этого периода число новых случаев COVID-19 несколько снизилось, что определило общую тенденцию динамики, которая характеризовалась умеренным снижением ($T = -1,3$ % в день). Всего за этот период зарегистрировано 75842 новых случая COVID-19. Следует отметить, что возраст-

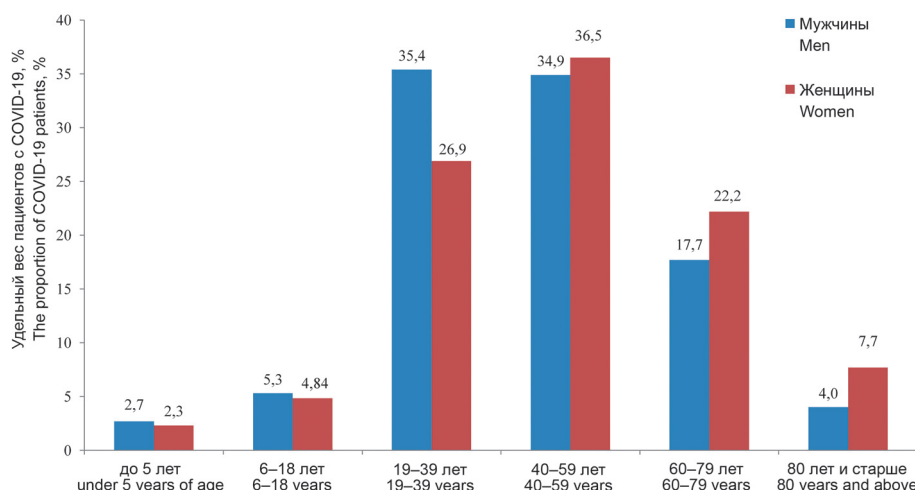


Рис. 2. Возрастная структура заболевших COVID-19 (мужчин и женщин) в период с 6 марта по 6 июля 2020 г. в Москве

Fig. 2. The age distribution of COVID-19 cases (men and women) between March 06, 2020 to July 06, 2020 in Moscow

ная структура пациентов с COVID-19, как мужчин, так и женщин, была идентична периоду роста заболеваемости. У мужчин преобладали пациенты двух возрастных групп – «19–39 лет» и «40–59 лет», чей удельный вес составил 34,5 % (34,0–35,0 %) и 34,6 % (34,1–35,1 %) соответственно. В возрастной структуре женщин с COVID-19 в этот период преобладали пациентки 40–59 лет – 36,7 % (36,2–37,1 %), доля женщин 19–39 лет была существенно ниже – 26,1 % (25,7–26,6 %).

Период умеренного снижения заболеваемости COVID-19 (16 мая – 6 июля 2020 г.) характеризовался постепенным уменьшением числа новых случаев заболевания. Если в начале этого периода регистрировали 2001 (08.06.2020) и 1572 (09.06.2020) пациента с COVID-19, то 05.07 и 06.07.2020 – 650 и 675 пациентов соответственно. Темп снижения за весь период составил 3,0 % в день (умеренное снижение). Возрастная структура заболевших COVID-19 в этот период не отличалась от периодов роста и стабильно высокого уровня заболеваемости. У мужчин среди заболевших в равной степени представлены возрастные группы «19–39 лет» и «40–59 лет» – по 33,8 % (33,3–34,3 %), у женщин – «40–59 лет» – 34,9 % (34,4–35,3 %).

Одной из важнейших задач системы эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями является выявление групп населения, наиболее активно вовлеченных в эпидемический процесс. Применительно к COVID-19 стоит задача разработки системы эпидемиологического надзора с опреде-

лением целевых групп населения, в отношении которых наиболее высок риск инфицирования, а также определения параметров мониторинга, которые обеспечат информационную достаточность для принятия адресных и эффективных управленческих решений. Средний возраст зарегистрированных пациентов с COVID-19 в Москве составил $(46,41 \pm 20,58)$ года. Изучаемая группа пациентов характеризовалась весьма значительной вариативностью возраста с преобладанием взрослых людей старше 19 лет, что обусловило формирование для последующего анализа групп взрослых пациентов с 20-летними возрастными диапазонами. Взрослые пациенты в Москве составили 92,7 % (92,6–92,8 %). По нашему мнению, столь ярко выраженное преобладание среди заболевших COVID-19 взрослого трудоспособного населения свидетельствует не об особенностях SARS-CoV-2, а о том, что своевременно принятые решения о прекращении работы школ и институтов, а также высокая исполнительская дисциплина в отношении режима самоизоляции позволили минимизировать риски заражения [8]. Есть основания полагать, что подавляющее большинство случаев заражения SARS-CoV-2 связано с контактно-бытовым путем передачи вируса в семьях инфицированных людей с бессимптомными формами COVID-19. Удельный вес детей среди всех заболевших COVID-19 составил 7,3 % (7,2–7,4 %). Следует отметить, что близкие данные об интенсивности вовлечения детей в эпидемический процесс COVID-19 представлены и исследователями других стран [9–13].

Возрастная структура заболевших COVID-19 в группах мужчин и женщин в различные периоды эпидемии в Москве

Age distribution in male and female groups of COVID-19 patients at different stages of epidemic in Moscow

Периоды эпидемии Stages of epidemic	N	Возрастные группы Age groups					
		До 6 лет Under 6 years	6–18 лет 6–18 years	19–39 лет 19–39 years	40–59 лет 40–59 years	60–79 лет 60–79 years	80 лет и старше 80 years and above
Мужчины Men							
Период завоза (06.03–24.03.2020) Period of importation (06.03–24.03.2020)	219	3,7 % (1,6–7,1 %)	4,1 % (1,9–7,7 %)	49,3 % (42,5–56,1 %)	32,0 % (25,8–38,6 %)	8,7 % (5,3–13,2 %)	2,3 % (0,8–5,3 %)
Период роста (25.03–01.05.2020) Incidence growth (25.03–01.05.2020)	31218	2,2 % (2,1–2,4 %)	4,0 % (3,8–4,2 %)	37,5 % (36,9–38,0 %)	36,2 % (35,6–36,7 %)	16,5 % (16,1–16,9 %)	3,6 % (3,4–3,8 %)
Период стабильно высокого уровня (02.05–15.05.2020) Consistently high level of incidence (02.05–15.05.2020)	35515	2,7 % (2,5–2,8 %)	5,7 % (5,5–6,0 %)	34,5 % (34,0–35,0 %)	34,6 % (34,1–35,1 %)	18,3 % (17,9–18,7 %)	4,2 % (4,1–4,4 %)
Период умеренного снижения (16.05–06.07.2020) Moderate decrement of morbidity (16.05–06.07.2020)	39378	3,2 % (3,1–3,4 %)	6,0 % (5,8–6,3 %)	33,8 % (33,4–34,3 %)	33,8 % (33,3–34,3 %)	18,8 % (18,4–19,2 %)	4,4 % (4,2–4,6 %)
Женщины Women							
Период завоза (06.03–24.03.2020) Period of importation (06.03–24.03.2020)	222	3,2 % (1,3–6,4 %)	3,2 % (1,3–6,4 %)	57,2 % (50,4–63,8 %)	23,4 % (18,0–29,6 %)	10,4 % (6,7–15,1 %)	2,7 % (1,0–5,8 %)
Период роста (25.03–01.05.2020) Incidence growth (25.03–01.05.2020)	30514	1,8 % (1,6–1,9 %)	3,8 % (3,4–4,0 %)	25,9 % (25,4–26,4 %)	39,0 % (38,5–39,6 %)	22,5 % (22,0–23,0 %)	7,1 % (6,8–7,4 %)
Период стабильно высокого уровня (02.05–15.05.2020) Consistently high level of incidence (02.05–15.05.2020)	40327	2,4 % (2,3–2,6 %)	4,5 % (4,3–4,7 %)	26,1 % (25,7–26,6 %)	36,7 % (36,2–37,1 %)	22,2 % (21,8–22,6 %)	8,1 % (7,8–8,4 %)
Период умеренного снижения (16.05–06.07.2020) Moderate decrement of morbidity (16.05–06.07.2020)	47220	2,5 % (2,4–2,6 %)	4,7 % (4,5–4,9 %)	28,1 % (27,6–28,5 %)	34,9 % (34,4–35,3 %)	21,8 % (21,4–22,1 %)	7,7 % (7,5–8,0 %)

С учетом того, что SARS-CoV-2 не обладает возрастной избирательностью и в равной степени способен заражать всех людей, средний возраст групп пациентов с COVID-19, разделенных по половому признаку, предсказуемо несколько различался в соответствии с демографической ситуацией в стране: средний возраст мужчин составил ($44,03 \pm 21,98$) года, женщин – ($48,19 \pm 24,71$) года. Столь высокие значения стандартных отклонений указывают на очень значительную вариативность возрастного распределения в рамках исследуемых групп.

Возрастная структура пациентов с COVID-19 в группах мужчин и женщин за весь период наблюдения имела отличия. Среди заболевших COVID-19 мужчин одинаково высокий удельный вес имели пациенты двух возрастных групп – «19–39 лет» и «40–59 лет» – соответственно 35,4 % ($35,1–35,7$ %) и 34,9 % ($34,6–35,2$ %). Среди женщин с COVID-19 возрастная структура имела несколько другие закономерности. Первую рейтинговую позицию занимали пациентки 40–59 лет, чей удельный вес составлял 36,5 % ($36,3–36,8$ %). Удельный вес пациенток возрастной группы «19–39 лет» был значительно ниже – 26,9 % ($26,6–27,1$ %). С нашей точки зрения, невысокий, по сравнению с группой мужчин, удельный вес этой возрастной группы женщин обусловлен тем, что главным образом именно они остаются на домашней самоизоляции с детьми. В то же время женщины более старшей возрастной группы, как правило, свободны от таких обязанностей и активно участвуют в обеспечении жизнедеятельности города (сфера торговли, транспорт, медицинские работники и др.) в условиях действия режимно-ограничительных мероприятий (локдаун). Можно отметить значительный удельный вес пациентов с COVID-19 возрастной группы «60–79 лет». Среди мужчин они составили 17,7 % ($17,4–17,9$ %), среди женщин – 22,2 % ($22,0–22,5$ %). С учетом того, что люди этой возрастной группы находились в режиме самоизоляции, объяснить случаи инфицирования SARS-CoV-2 только контактно-бытовой передачей не представляется возможным. По нашему мнению, высокий удельный вес пациентов возрастной группы «60–79 лет» можно объяснить еще и тем, что среди них много работающих пенсионеров, что отразилось на вовлеченности пожилых людей в эпидемический процесс. По данным зарубежных исследователей, удельный вес пожилых людей среди заболевших COVID-19 также весьма значителен и для пациентов старше 70 лет высок риск смертельного исхода [14–18].

Анализ возрастной структуры заболевших COVID-19 в отдельные периоды эпидемии в Москве позволил выявить некоторые отличия. В начальный период (с 6 по 24 марта 2020 г.) COVID-19 регистрировали преимущественно у лиц возрастной группы «19–39 лет». Мужчины этого возраста среди всех заболевших составили 49,3 % ($42,5–56,1$ %), женщины – 57,2 % ($50,4–63,8$ %). Вторые рейтинговые

позиции по удельному весу заболевших COVID-19 в период завоза заняли пациенты возрастной группы «40–59 лет». У мужчин удельный вес пациентов этой возрастной группы составил 32,0 % ($25,8–38,6$ %), у женщин – 23,4 % ($18,0–29,6$ %). Особенностью периода завоза стал массовый возврат российских туристов из разных стран, в том числе в которых на тот момент эпидемия COVID-19 была на пике развития [19–21]. Москва является крупным пунктом пересадки пассажиров, в который прибывают туристы из разных стран мира, а потом разъезжаются по городам проживания. Ограничительные меры, действовавшие в период завоза, регламентировались Постановлением Главного санитарного врача РФ от 31.01.2020 г. № 3 «О проведении дополнительных санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий по недопущению завоза и распространения новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV», а также Распоряжением Правительства РФ от 16.03.2020 г. № 635-р (ред. от 15.05.2020 г.) «О временном ограничении въезда в Российскую Федерацию иностранных граждан и лиц без гражданства и временном приостановлении оформления и выдачи виз и приглашений». Очевидно, что принятые меры, определенные этими документами, были эффективными, но не смогли предотвратить завоз на территорию РФ SARS-CoV-2. В результате в Москве и других городах РФ в марте началась эпидемия COVID-19.

С 25 марта в Москве зарегистрировали скачкообразный рост числа новых случаев COVID-19 (с 28 до 120 случаев заболевания), что свидетельствовало о выходе SARS-CoV-2 в популяцию. В последующие дни, вплоть до 1 мая, количество ежедневно выявляемых случаев COVID-19 только нарастало, достигнув на пике 7 и 11 мая 6703 и 6169 заболевших соответственно. Следует отметить, что в этот период, обозначенный нами как период роста заболеваемости, а также в период стабильного высокого уровня (2–15 мая 2020 г.) и в период умеренного снижения заболеваемости возрастная структура пациентов с COVID-19 (16.05–06.07 2020) была идентична (таблица). У мужчин и женщин с COVID-19 в эти три периода в возрастной структуре преобладали пациенты возрастных групп «19–39 лет» и «40–59 лет». Отличием от периода завоза стал существенно меньший удельный вес пациентов 19–39 лет, при этом доля пациентов 40–59 лет выросла, особенно в группе женщин.

Первые случаи COVID-19 зафиксированы у возвратившихся туристов и их семейного окружения. В течение примерно трех недель ситуация оставалась стабильной с единичными случаями заболевания. В этот период COVID-19 регистрировали преимущественно у лиц 19–39 лет, то есть наиболее активного возраста. Постепенное увеличение числа новых случаев COVID-19 привело к качественным изменениям в эпидемическом процессе, SARS-CoV-2 вышел в популяцию и, несмотря на

действующий локдаун, за счет того, что необходимо было поддерживать городское хозяйство и обеспечивать медицинскую помощь населению, распространение вируса стало интенсивным. В период роста заболеваемости и в последующие периоды основной движущей силой эпидемического процесса в Москве являлись лица возрастных групп «19–39 лет» и «40–59 лет». Можно констатировать, что именно на эти возрастные группы следует нацеливать комплекс противоэпидемических мероприятий. В то же время, как показал анализ, люди более старших возрастных групп также существенно вовлечены в эпидемический процесс COVID-19. Общая доля пациентов в возрасте старше 60 лет составила 26,2 % (26,0–26,4 %), что весьма существенно и требует определения особых подходов к тактике противоэпидемической работы, учитывая возрастные особенности контингента. Следует отметить, что пациенты старше 60 лет оказались наиболее уязвимым контингентом с точки зрения тяжести течения COVID-19 и риска летального исхода. Обсуждение возможностей минимизировать угрозу заражения SARS-CoV-2 специалистами разных стран показало ограниченность средств [22–26]. Обобщая высказанные соображения, можно выделить несколько консенсусных позиций. Главное – необходимо физическое, а не социальное дистанцирование. При соблюдении этого условия необходимо обеспечить удаленный доступ к медицинской помощи и создать различные инструменты, позволяющие наладить возможность связи пожилых людей, находящихся на самоизоляции. Также необходим психологический контроль для своевременного выявления депрессивных состояний и оперативного их купирования.

Удельный вес детей среди заболевших COVID-19, как показано выше, относительно невелик, что для инфекционных заболеваний, распространяющихся посредством аэрозольного (воздушно-капельного) механизма передачи, совершенно нехарактерно. Вместе с тем исследователи отмечают сравнительно доброкачественное течение инфекционного процесса COVID-19 у детей. Так, Е.Р. Мескина, проведя ретроспективный анализ всех педиатрических случаев лабораторно подтвержденного COVID-19 в Московской области, констатировала значительное преобладание бессимптомных форм (62,2 %) и низкую частоту тяжелых форм (0,38 %) при отсутствии летальных случаев [7].

Таким образом, среди пациентов с COVID-19 за период наблюдения регистрировалось некоторое преобладание женщин, чей удельный вес составил 52,7 % (52,5–52,9 %), тогда как мужчин – 47,3 % (47,1–47,6 %). Возрастная структура всех заболевших COVID-19 за период наблюдения характеризуется преобладанием пациентов 40–59 лет – 35,7 % (35,5–35,9 %), при этом пациенты старше 19 лет составляют 92,7 % (92,6–92,8 %). Установлены различия в гендерном распределении пациентов в за-

висимости от возраста: среди заболевших до 39 лет преобладали мужчины, чей удельный вес составил 53,7 % (53,3–54,0 %), тогда как женщин – 46,3 % (46,0–46,7 %). Гендерная пропорция пациентов старше 40 лет характеризовалась значительным преобладанием женщин – 60,7 % (60,4–61,0 %) / 39,3 % (39,1–39,6 %).

Также выявлены различия в возрастной структуре мужчин и женщин с COVID-19: среди мужчин в равной степени представлены пациенты 19–39 и 40–59 лет – 35,4 % (35,1–35,7 %) и 34,9 % (34,6–35,2 %) соответственно, среди женщин преобладали пациентки 40–59 лет – 36,5 % (36,3–36,8 %).

Показано отсутствие различий в возрастной структуре заболевших COVID-19 в периоды роста, стабильно высокого уровня и умеренного снижения заболеваемости, что свидетельствует об идентичных закономерностях на всех этапах эпидемического процесса. Отличия в возрастной структуре заболевших COVID-19 в период завоза, вероятно, связаны с массовым возвратом туристов в РФ транзитом через транспортную сеть Москвы.

По сравнению с такими странами, как США, Франция, Италия, Испания, Бразилия и др., эпидемиологическую ситуацию в Российской Федерации следует признать относительно удовлетворительной, но оснований считать, что все идет к благополучному завершению, нет. Определение основных целевых групп населения для разработки адресных и максимально эффективных противоэпидемических мер показало их отсутствие, поскольку как наш, так и мировой опыт свидетельствует о равномерном вовлечении в эпидемический процесс всех возрастных групп, за исключением детей. Очевидна необходимость продолжения исследований, поскольку эпидемия COVID-19 еще далека от завершения, а перспективы ее купирования могут базироваться на максимально полном и точном знании закономерностей этой новой болезни.

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

Список литературы

1. Lechien J.R., Chiesa-Estomba C.M., Place S., Laethem Y.V., Cabaraux P., Mat Q., Huet K., Plzak J., Horoi M., Hans S., Barillari M.R., Cammaroto G., Fakhry N., Martiny D., Ayad T., Jouffé L., Hopkins C., Saussez S. Clinical and epidemiological characteristics of 1420 European patients with mild-to-moderate coronavirus disease 2019. *J. Intern. Med.* 2020; 30;10.1111/joim.13089. DOI: 10.1111/joim.13089.
2. Conti P., Younes A. Coronavirus COV-19/SARS-CoV-2 affects women less than men: clinical response to viral infection. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2020; 34(2):339–43. DOI: 10.23812/Editorial-Conti-3.
3. Petrilli C.M., Jones S.A., Yang J., Rajagopalan H., O'Donnell L., Chernyak Y., Tobin K.A., Cerfolio R.J., Francois F., Horwitz L.I. Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. *BMJ.* 2020; 369:m1966. DOI: 10.1136/bmj.m1966.
4. Suleyman G., Fadel R.A., Malette K.M., Hammond C., Abdulla H., Entz A., Demertzis Z., Hanna Z., Failla A., Dagher C., Chaudhry Z., Vahia A., Lanfranco O.A., Ramesh M., Zervos M.J., Alangaden G., Miller J., Brar I. Clinical characteristics and morbidity associated with coronavirus disease 2019 in a series of patients in

- Metropolitan Detroit. *JAMA Netw. Open.* 2020; 3(6):e2012270. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.12270.
5. Ваганов П.Д., Яновская Э.Ю., Манджиева Э.Т. Периоды детского возраста. *Российский медицинский журнал.* 2018; 24(4):185–90. DOI: 10.18821/0869-2106-2018-24-4-185-190.
 6. Беляков В.Д., Дегтярев А.А., Иванников Ю.Г. Качество и эффективность противоэпидемических мероприятий. *Л.: Медицина*; 1981. 304 с.
 7. Мескина Е.Р. Предварительный клинико-эпидемиологический анализ первых 1000 случаев COVID-19 у детей в Московской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(3): 202–15. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-3-2.
 8. Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А., Шипулина О.Ю., Яцышина С.Б., Тиванова Е.В., Каленская А.В., Соловьёва И.В., Вершинина М.А., Квасова О.А., Плоскирева А.А., Мамошина М.В., Елькина М.А., Клушкина В.В., Андреева Е.Е., Иваненко А.В. Закономерности эпидемического распространения SARS-CoV-2 в условиях мегаполиса. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(4):203–211. DOI: 10.36233/0507-4088-2020-65-4-203-211.
 9. Ludvigsson J.F. Systematic review of COVID-19 in children shows milder cases and a better prognosis than adults. *Acta Paediatr.* 2020; 109(6):1088–95. DOI: 10.1111/apa.15270.
 10. Dhochak N., Singhal T., Kabra S.K., Lodha R. Pathophysiology of COVID-19: why children fare better than adults? *Indian J Pediatr.* 2020; 87(7):537–46. DOI: 10.1007/s12098-020-03322-y.
 11. Dong Y., Mo X., Hu Y., Qi X., Jiang F., Jiang Z., Tong S. Epidemiology of COVID-19 among children in China. *Pediatrics.* 2020; 145(6):e20200702. DOI: 10.1542/peds.2020-0702.
 12. She J., Liu L., Liu W. COVID-19 epidemic: disease characteristics in children. *J. Med. Virol.* 2020; 92(7):747–54. DOI: 10.1002/jmv.25807.
 13. CDC COVID-19 Response Team. Coronavirus Disease 2019 in Children – United States, February 12 – April 2, 2020. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2020; 69(14):422–26. DOI: 10.15585/mmwr.mm6914e4.
 14. Remuzzi A., Remuzzi G. COVID-19 and Italy: what next? *Lancet.* 2020; 395(10231):1225–8. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30627-9.
 15. Nikpouraghdad M., Farahani A.J., Alishiri G.H., Heydari S., Ebrahimi M., Samadinia H., Sepandi M., Jafari N.J., Izadi M., Qazvini A., Dorostkar R., Tat M., Shahriary A., Farnoosh G., Zijoud S.R.H., Taghdiri M., Alimohamadi Y., Abbaszadeh S., Ghaleh H.E.G., Bagheri M. Epidemiological characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients in IRAN: A single center study. *J. Clin. Virol.* 2020; 127:104378. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104378.
 16. Martín-Sánchez F.J., Del Toro E., Cardassay E., Carbó A.V., Cuesta F., Vigarra M., Gil P., Picado A.L.L., Valero C.M., Miranda J.D., Lopez-Ayala P., Chaparro D., López G.C., Suárez-Cadenas M.D.M., Fernández P.J., Angós B., Arco C.D.D., Adrada E.R., Moraleda M.T.M., Paeres C.E., Alonso C.F., Elvira C., Chacón A., Briñón M.A.G., Rueda J.L.F., Ortega L., Pérez C.F., Armengol J.J.G., Del Castillo J.G. Clinical presentation and outcome across age categories among patients with COVID-19 admitted to a Spanish Emergency Department. *Eur. Geriatr. Med.* 2020; 1–13. DOI: 10.1007/s41999-020-00359-2.
 17. Gudbjartsson D.F., Helgason A., Jonsson H., Magnusson O.T., Melsted P., Norddahl G.L., Saemundsdottir J., Sigurdsson A., Sulem P., Agustsdottir A.B., Eiriksdottir B., Fridriksdottir R., Gardarsdottir E.E., Georgsson G., Gretarsdottir O.S., Gudmundsson K.R., Gunnarsdottir T.R., Gylfason A., Holm H., Jonsson B.O., Jonasdottir A., Jonsson F., Josefsdottir K.S., Kristjansson T., Magnusdottir D.N., le Roux L., Sigmundsdottir G., Sveinbjornsson G., Sveinsdottir K.E., Sveinsdottir M., Thorarensen E.A., Thorbjornsson B., Löve A., Masson G., Jonsdottir I., Möller A.D., Gudnason T., Kristinsson K.G., Thorsteinsdottir U., Stefansson K. Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic population. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(24):2302–15. DOI: 10.1056/NEJMoa2006100.
 18. Gujski M., Raciborski F., Jankowski M., Nowicka P.M., Rakocy K., Pinkas J. Epidemiological analysis of the first 1389 cases of COVID-19 in Poland: A Preliminary Report. *Med. Sci. Monit.* 2020; 26:e924702. DOI: 10.12659/MSM.924702.
 19. Sebastiani G., Massa M., Riboli E. Covid-19 epidemic in Italy: evolution, projections and impact of government measures. *Eur. J. Epidemiol.* 2020; 35(4):341–5. DOI: 10.1007/s10654-020-00631-6.
 20. Rothe C., Schunk M., Sothmann P., Bretzel G., Froeschl G., Wallrauch C., Zimmer T., Thiel V., Janke C., Guggemos W., Drosten C., Vollmar P., Zwirgmaier K., Zange S., Wölfel R., Hoelscher M. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(10):970–1. DOI: 10.1056/NEJMc200146.
 21. Holshue M.L., DeBolt C., Lindquist S., Lofy K.H., Wiesman J., Bruce H., Spitters C., Ericson K., Wilkerson S., Tural A., Diaz G., Cohn A., Fox LeAnne, Patel A., Gerber S.I., Kim L., Tong S., Lu X., Lindstrom S., Pallansch M.A., Weldon W.C., Biggs H.M., Uyeki T.M., Pillai S.K. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(10):929–36. DOI: 10.1056/NEJMoa2001191.
 22. Yang P., Huang L.K. Successful prevention of COVID-19 outbreak at elderly care institutions in Taiwan. *J. Formos Med. Assoc.* 2020; 119(8):1249–50. DOI: 10.1016/j.jfma.2020.05.024.
 23. Fisman D.N., Bogoch I., Lapointe-Shaw L., McCready J., Tuite A.R. Risk factors associated with mortality among residents with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in long-term care facilities in Ontario, Canada. *JAMA Netw. Open.* 2020; 3(7):e2015957. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.15957.
 24. Nanda A., Vura N.V.R.K., Gravenstein S. COVID-19 in older adults. *Aging Clin. Exp. Res.* 2020; 32(7):1199–202. DOI: 10.1007/s40520-020-01581-5.
 25. Nicol G.E., Piccirillo J.F., Mulsant B.H., Lenze E.J. Action at a distance: geriatric research during a pandemic. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2020; 68(5):922–5. DOI: 10.1111/jgs.16443.
 26. Koeberle S., Tannou T., Bouillier K., Becoulet N., Outrey J., Chirouze C., Aubry R. COVID-19 outbreak: organisation of a geriatric assessment and coordination unit. A French example. *Age Ageing.* 2020; 49(4):516–22. DOI: 10.1093/ageing/afaa092.

References

1. Lechien J.R., Chiesa-Estomba C.M., Place S., Laethem Y.V., Cabaraux P., Mat Q., Huet K., Plzak J., Horoi M., Hans S., Barillari M.R., Cammaroto G., Fakhry N., Martiny D., Ayad T., Jouffe L., Hopkins C., Saussez S. Clinical and epidemiological characteristics of 1420 European patients with mild-to-moderate coronavirus disease 2019. *J. Intern. Med.* 2020; 30;10.1111/joim.13089. DOI: 10.1111/joim.13089.
2. Conti P., Younes A. Coronavirus COV-19/SARS-CoV-2 affects women less than men: clinical response to viral infection. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2020; 34(2):339–43. DOI: 10.23812/Editorial-Conti-3.
3. Petrilli C.M., Jones S.A., Yang J., Rajagopalan H., O'Donnell L., Chernyak Y., Tobin K.A., Cerfolio R.J., Francois F., Horwitz L.I. Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. *BMJ.* 2020; 369:m1966. DOI: 10.1136/bmj.m1966.
4. Suleyman G., Fadel R.A., Malette K.M., Hammond C., Abdulla H., Entz A., Demertzis Z., Hanna Z., Failla A., Dagher C., Chaudhry Z., Vahia A., Lanfranco O.A., Ramesh M., Zervos M.J., Alangaden G., Miller J., Brar I. Clinical characteristics and morbidity associated with coronavirus disease 2019 in a series of patients in Metropolitan Detroit. *JAMA Netw. Open.* 2020; 3(6):e2012270. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.12270.
5. Ваганов П.Д., Яновская Э.Ю., Манджиева Э.Т. [Childhood periods]. *Rossiyskiy Meditsynskiy Zhurnal [Russian Medical Journal]*. 2018; 24(4):185–90. DOI: 10.18821/0869-2106-2018-24-4-185-190.
6. Belyakov V.D., Degtyarev A.A., Ivannikov Yu.G. [The Quality and Effectiveness of Anti-Epidemic Measures]. *L.: Meditsyna*; 1981. 304 p.
7. Meskina E.R. [Preliminary clinical and epidemiological analysis of the first 1000 cases of COVID-19 in children in the Moscow Region]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2020; 97(3):202–15. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-3-2.
8. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenenko T.A., Shipulina O.Yu., Yatsyshina S.B., Tivanova E.V., Kalenskaya A.V., Solovyova I.V., Verшинina M.A., Kvasova O.A., Ploskireva A.A., Mamoshina M.V., Elkina M.A., Klushkina V.V., Andreeva E.E., Ivanenko A.V. [Patterns of the epidemic spread of SARS-CoV-2 in a metropolis]. *Voprosy virusologii [Virology Issues]*. 2020; 65(4):203–11. DOI: 10.36233/0507-4088-2020-65-4-203-211.
9. Ludvigsson J.F. Systematic review of COVID-19 in children shows milder cases and a better prognosis than adults. *Acta Paediatr.* 2020; 109(6):1088–95. DOI: 10.1111/apa.15270.
10. Dhochak N., Singhal T., Kabra S.K., Lodha R. Pathophysiology of COVID-19: why children fare better than adults? *Indian J Pediatr.* 2020; 87(7):537–46. DOI: 10.1007/s12098-020-03322-y.
11. Dong Y., Mo X., Hu Y., Qi X., Jiang F., Jiang Z., Tong S. Epidemiology of COVID-19 among children in China. *Pediatrics.* 2020; 145(6):e20200702. DOI: 10.1542/peds.2020-0702.
12. She J., Liu L., Liu W. COVID-19 epidemic: disease characteristics in children. *J. Med. Virol.* 2020; 92(7):747–54. DOI: 10.1002/jmv.25807.
13. CDC COVID-19 Response Team. Coronavirus Disease 2019 in Children – United States, February 12 – April 2, 2020. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2020; 69(14):422–26. DOI: 10.15585/mmwr.mm6914e4.
14. Remuzzi A., Remuzzi G. COVID-19 and Italy: what next? *Lancet.* 2020; 395(10231):1225–8. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30627-9.

15. Nikpouraghdam M., Farahani A.J., Alishiri G.H., Heydari S., Ebrahimnia M., Samadinia H., Sepandi M., Jafari N.J., Izadi M., Qazvini A., Dorostkar R., Tat M., Shahriary A., Farnoosh G., Zijoud S.R.H., Taghdir M., Alimohamadi Y., Abbaszadeh S., Ghaleh H.E.G., Bagheri M. Epidemiological characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients in IRAN: A single center study. *J. Clin. Virol.* 2020; 127:104378. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104378.
 16. Martín-Sánchez F.J., Del Toro E., Cardassay E., Carbó A.V., Cuesta F., Vigarà M., Gil P., Picado A.L.L., Valero C.M., Miranda J.D., Lopez-Ayala P., Chaparro D., López G.C., Suárez-Cadenas M.D.M., Fernández P.J., Angós B., Arco C.D.D., Adrada E.R., Moraleda M.T.M., Paeres C.E., Alonso C.F., Elvira C., Chacón A., Briñón M.A.G., Rueda J.L.F., Ortega L., Pérez C.F., Armengol J.J.G., Del Castillo J.G. Clinical presentation and outcome across age categories among patients with COVID-19 admitted to a Spanish Emergency Department. *Eur. Geriatr. Med.* 2020; 1–13. DOI: 10.1007/s41999-020-00359-2.
 17. Gudbjartsson D.F., Helgason A., Jonsson H., Magnusson O.T., Melsted P., Norddahl G.L., Saemundsdóttir J., Sigurdsson A., Sulem P., Agustsdóttir A.B., Eiríksdóttir B., Fridriksdóttir R., Gardarsdóttir E.E., Georgsson G., Gretarsdóttir O.S., Gudmundsson K.R., Gunnarsdóttir T.R., Gylfason A., Holm H., Jónsson B.O., Jónasdóttir A., Jónsson F., Jónsdóttir K.S., Kristjánsson T., Magnúsdóttir D.N., le Roux L., Sigmundsdóttir G., Sveinbjörnsson G., Sveinsdóttir K.E., Sveinsdóttir M., Thorarensen E.A., Thorbjörnsson B., Löve A., Masson G., Jónsdóttir I., Möller A.D., Gudnason T., Kristinsson K.G., Thorsteinsdóttir U., Stefánsson K. Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic population. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(24):2302–15. DOI: 10.1056/NEJMoa2006100.
 18. Gujski M., Raciborski F., Jankowski M., Nowicka P.M., Rakocy K., Pinkas J. Epidemiological analysis of the first 1389 cases of COVID-19 in Poland: A Preliminary Report. *Med. Sci. Monit.* 2020; 26:e924702. DOI: 10.12659/MSM.924702.
 19. Sebastiani G., Massa M., Riboli E. Covid-19 epidemic in Italy: evolution, projections and impact of government measures. *Eur. J. Epidemiol.* 2020; 35(4):341–5. DOI: 10.1007/s10654-020-00631-6.
 20. Rothe C., Schunk M., Sothmann P., Bretzel G., Froeschl G., Wallrauch C., Zimmer T., Thiel V., Janke C., Guggemos W., Drosten C., Vollmar P., Zwirgmaier K., Zange S., Wölfel R., Hoelscher M. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(10):970–1. DOI: 10.1056/NEJMc200146.
 21. Holshue M.L., DeBolt C., Lindquist S., Lofy K.H., Wiesman J., Bruce H., Spitters C., Ericson K., Wilkerson S., Tural A., Diaz G., Cohn A., Fox LeAnne, Patel A., Gerber S.I., Kim L., Tong S., Lu X., Lindstrom S., Pallansch M.A., Weldon W.C., Biggs H.M., Uyeki T.M., Pillai S.K. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(10):929–36. DOI: 10.1056/NEJMoa2001191.
 22. Yang P., Huang L.K. Successful prevention of COVID-19 outbreak at elderly care institutions in Taiwan. *J. Formos Med. Assoc.* 2020; 119(8):1249–50. DOI: 10.1016/j.jfma.2020.05.024.
 23. Fisman D.N., Bogoch I., Lapointe-Shaw L., McCready J., Tuite A.R. Risk factors associated with mortality among residents with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in long-term care facilities in Ontario, Canada. *JAMA Netw. Open.* 2020; 3(7):e2015957. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.15957.
 24. Nanda A., Vura N.V.R.K., Gravenstein S. COVID-19 in older adults. *Aging Clin. Exp. Res.* 2020; 32(7):1199–202. DOI: 10.1007/s40520-020-01581-5.
 25. Nicol G.E., Piccirillo J.F., Mulsant B.H., Lenze E.J. Action at a distance: geriatric research during a pandemic. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2020; 68(5):922–5. DOI: 10.1111/jgs.16443.
 26. Koeberle S., Tannou T., Bouiller K., Becoulet N., Outrey J., Chirouze C., Aubry R. COVID-19 outbreak: organisation of a geriatric assessment and coordination unit. A French example. *Age Ageing.* 2020; 49(4):516–22. DOI: 10.1093/ageing/afaa092.
- Authors:**
Akimkin V.G., Kuzin S.N., Ploskireva A.A., Dubodelov D.V., Tivanova E.V., Pshenichnaya N.Yu., Kalenskaya A.V., Yatsyshina S.B., Shipulina O.Yu., Rodionova E.N., Petrova N.S., Solov'eva I.V., Kvasova O.A., Vershinina M.A., Mamoshina M.V., Klushkina V.V., Churilova N.S., Panasyuk Ya.V., Vlasenko N.V., Ostroushko A.A., Balmasov E.S., Mosunov A.V. Central Research Institute of Epidemiology. 3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russian Federation. E-mail: crie@pcr.ru.
Semenenko T.A. N.F. Gamaley National Research Center of Epidemiology and Microbiology. 18, Gamaleya St., Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: semenenko@gamaleya.org.
- Об авторах:**
Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Плоскирева А.А., Дубоделов Д.В., Тиванова Е.В., Пшеничная Н.Ю., Каленская А.В., Яцышина С.Б., Шипулина О.Ю., Родионова Е.Н., Петрова Н.С., Соловьева И.В., Квасова О.А., Вершинина М.А., Мамошина М.В., Клушкина В.В., Чурилова Н.С., Панасюк Я.В., Власенко Н.В., Остроушко А.А., Балмасов Е.С., Мосунов А.В. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. Российская Федерация, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а. E-mail: crie@pcr.ru.
Семененко Т.А. Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи. Российская Федерация, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18. E-mail: semenenko@gamaleya.org.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-36-42

УДК 616.98:578.2

А.И. Блох^{1,2}, Н.А. Пен'евская^{1,2}, Н.В. Рудаков^{1,2}, И.И. Лазарев², О.А. Михайлова³, А.С. Федоров³,
Ю.А. Пневский⁴

ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ COVID-19 В ОМСКОЙ ОБЛАСТИ НА ФОНЕ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ

¹ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций», Омск, Российская Федерация;
²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», Омск, Российская Федерация; ³ФБУЗ «Центр гигиены
и эпидемиологии в Омской области», Омск, Российская Федерация; ⁴Управление Роспотребнадзора по Омской области, Омск,
Российская Федерация

Цель – изучить распространение COVID-19 среди населения Омской области на протяжении 24 недель эпидемического неблагополучия на фоне противоэпидемических мероприятий. **Материалы и методы.** Использованы открытые данные и данные ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области» по официальному учету и эпидемиологическому расследованию выявленных случаев COVID-19 на территории Омской области за период с 27 марта по 10 сентября 2020 г. Рассчитывали экспоненциальный темп прироста (r), базовый и эффективный показатели репродукции (R_0 и R_t), ожидаемый естественный размах эпидемии и порог коллективного иммунитета. Обработка данных выполнена с использованием MS Excel 2010. Построение картограммы проводилось в приложении QGIS 3.12-Bukuresti в системе координат EPSG: 3576. **Результаты и обсуждение.** За период с 27 марта по 10 сентября 2020 г. на территории Омской области зарегистрировано 9779 случаев COVID-19, показатель заболеваемости составил 507,6 ‰_{10000} (95 % ДИ 497,5–517,6), летальность по завершённым случаям – 2,9 %, по выявленным случаям – 2,4 %. Наиболее активное распространение COVID-19 отмечено в Омске и 4 (из 32) районах области (Москаленском, Азовском немецком национальном, Марьяновском, Нововаршавском). На фоне проводимых противоэпидемических мероприятий экспоненциальный темп прироста кумулятивного количества случаев COVID-19 составлял 4,5 % в сутки, R_0 – 1,4–1,5, R_t – 1,10. Ожидаемый размах эпидемии при условии продолжения действия ограничительных мер может достигнуть 58,0 % переболевшего населения. Уменьшение количества выявляемых вирусоносителей и неполное выявление COVID-19 среди заболевших внебольничными пневмониями создают дополнительные риски для скрытого распространения инфекции и осложнения эпидемической ситуации. Сохранение ограничительных мероприятий и превышение порога коллективного иммунитета (28,6 % населения) позволит значительно снизить риски усиления распространения COVID-19 в Омской области.

Ключевые слова: эпидемиология, COVID-19, экспоненциальный темп прироста, показатель репродукции, ожидаемый естественный размах эпидемии, порог коллективного иммунитета.

Корреспондирующий автор: Пен'евская Наталья Александровна, e-mail: nap20052005@yandex.ru.

Для цитирования: Блох А.И., Пен'евская Н.А., Рудаков Н.В., Лазарев И.И., Михайлова О.А., Федоров А.С., Пневский Ю.А. Эпидемический потенциал COVID-19 в Омской области на фоне противоэпидемических мероприятий. Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 3:36–42. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-36-42

Поступила 15.09.20. Принята к публ. 18.09.20.

A.I. Blokh^{1,2}, N.A. Pen'evskaya^{1,2}, N.V. Rudakov^{1,2}, I.I. Lazarev², O.A. Mikhailova³, A.S. Fedorov³,
Y.A. Pnevsky⁴

Epidemic Potential of COVID-19 in Omsk Region during Anti-Epidemic Measures

¹Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation;

²Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;

³Center for Hygiene and Epidemiology in Omsk Region, Omsk, Russian Federation;

⁴Rospotrebnadzor Administration in Omsk Region, Omsk, Russian Federation

Abstract. Aim. To study the spread of COVID-19 among the population of the Omsk Region during 24 weeks of the epidemic on the background of anti-epidemic measures. **Materials and methods.** A descriptive epidemiological study was carried out based on publically available data and data from the Center for Hygiene and Epidemiology in the Omsk Region on the official registration and epidemiological investigation of detected COVID-19 cases in the Omsk Region for the period from March 27 to September 10, 2020. To assess the potential of COVID-19 to spread, the following indicators were calculated: exponential growth rate (r), basic reproduction number (R_0), effective reproduction number (R_t), expected natural epidemic size and herd immunity threshold. Data processing was performed using MS Excel 2010. The cartogram was built using the QGIS 3.12-Bukuresti application in the EPSG: 3576 coordinate system. **Results and discussion.** For the period from March 27 to September 10, 2020, a total of 9779 cases of COVID-19 were registered in the Omsk Region, the cumulative incidence was 507,6 per 100000 (95 % CI 497,5–517,6), the case-fatality rate for completed cases was 2.9 %, for identified cases – 2.4 %. The most active spread of COVID-19 was noted in Omsk and 4 out of 32 districts of the region (Moskalensky, Azov German National, Mariyanovsky, Novovarshavsky). During the ongoing anti-epidemic measures, the exponential growth rate of the cumulative number of COVID-19 cases was 4.5 % per day, R_0 – 1.4–1.5, R_t – 1.10, herd immunity threshold – 28.6 %. The expected size of the epidemic in case of sustained anti-epidemic measures can reach 58.0 % of the recovered population. A decrease in the number of detected virus

carriers, incomplete detection of COVID-19 among patients with community-acquired pneumonia introduced additional risks for the latent spread of infection and complications of the epidemic situation. Maintaining restrictive measures and increasing the proportion of the immune population (over 28.6 %) may significantly reduce the risks of increasing the spread of COVID-19 in the Omsk Region.

Key words: epidemiology, COVID-19, exponential growth rate, reproductive number, final size of epidemic, herd immunity threshold.

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

Corresponding author: Natalia A. Pen'evskaya, e-mail: nap20052005@yandex.ru.

Citation: Blokh A.I., Pen'evskaya N.A., Rudakov N.V., Lazarev I.I., Mikhailova O.A., Fedorov A.S., Pnevsky Y.A. Epidemic Potential of COVID-19 in Omsk Region during Anti-Epidemic Measures. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:36–42. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-36-42

Received 15.09.20. Accepted 18.09.20.

Blokh A.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0756-2271>

Pen'evskaya N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7220-4366>

Rudakov N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9566-9214>

Lazarev I.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6811-9986>

Mikhailova O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6091-3424>

Fedorov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9099-1287>

Pnevsky Y.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0321-2370>

Эпидемия новой коронавирусной инфекции COVID-19 признана ВОЗ ситуацией в области здравоохранения, имеющей международное значение [1]. К 12 сентября 2020 г. COVID-19 выявлен у 28330022 человек и унес жизни 911880, при этом на долю Российской Федерации приходилось 1057362 случая заболевания и 18484 летальных исхода [2]. Сложившаяся ситуация представляет уникальные возможности для эпидемиологического изучения распространения нового патогена, к которому существенная часть населения не имеет иммунитета.

Распространение COVID-19 в Омской области происходило на фоне противоэпидемических мероприятий. Первые случаи COVID-19 на территории Омской области выявлены 27 марта 2020 г., то есть на месяц позже, чем в Москве. За 10 дней до выявления первых инфицированных в Омской области указом губернатора введен режим повышенной готовности с соответствующими мерами по недопущению завоза и распространения новой коронавирусной инфекции, сохраняющийся до конца сентября. С 1 апреля в Омской области установлен особый режим самоизоляции, включающий перевод образовательных организаций на дистанционный режим работы, запрет массовых мероприятий, закрытие дошкольных учреждений, приостановление деятельности несистемообразующих организаций и предприятий, ограничение передвижения внутри и за пределами г. Омска и прочее. Частичное ослабление режима самоизоляции введено с 4 июня 2020 г., с середины июня регион перешел на второй этап смягчения ограничительных мер, действие масочного режима продлено до 29 сентября.

Цель исследования: изучить распространение COVID-19 среди населения Омской области на протяжении 24 недель эпидемического неблагополучия на фоне противоэпидемических мероприятий.

Материалы и методы

Материалом для настоящего описательного эпидемиологического исследования послужили данные

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по Омской области» по официальному учету и эпидемиологическому расследованию выявленных случаев COVID-19 на территории Омской области за период с 27 марта (выявление первых инфицированных) по 10 сентября 2020 г. Все выявленные случаи подтверждены методом ПЦР в одной из лабораторий, действующих на территории региона: ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области» в соответствии с утвержденной маршрутизацией. По каждому случаю COVID-19 собиралась информация о поле и возрасте, предполагаемом месте и источнике заражения (для местных случаев), дате появления симптомов, клиническом течении на момент регистрации.

Кроме того, в исследовании использовали данные таких интернет-ресурсов, как «стопкоронавирус.рф», mzdr.omskportal.ru, а также официальных интернет-страниц оперативных штабов по предупреждению завоза и распространения новой коронавирусной инфекции в соседних с Омской областью регионах РФ и Республики Казахстан.

Для оценки исходного потенциала COVID-19 к распространению на территории Омской области вычислен базовый показатель репродукции (R_0), а для оперативной оценки ситуации использовали эффективный показатель репродукции (R_t). Методика расчета базового показателя репродукции описана J. Wallinga, M. Lipsitch [3] и предполагает знание величин экспоненциального темпа прироста (*intrinsic growth factor*) и серийного интервала (СИ). Экспоненциальный темп прироста (r) вычисляли с помощью простой регрессии Пуассона [3] из кумулятивного числа случаев за период с начала регистрации до 15 апреля – даты, на которую коэффициент детерминации был наибольшим и составлял 93,3 %. Оценку СИ проводили по литературным данным.

Серийный интервал является легко вычисляемой альтернативой времени генерации – промежутка между заражением двух человек в единой эпидемической цепочке. Более длительный серийный интервал является благоприятным прогностическим при-

знаком для системы эпидемиологического надзора: он фактически означает большой запас времени на проведение эпидемиологических расследований и необходимое реагирование [4]. Серийный интервал COVID-19 сегодня оценивается в 4–8 дней, с большинством оценок около 4 дней. В расчетах мы использовали оценку в 3,96 (95 % ДИ 3,53–4,39) дня из крупнейшего исследования M. Park *et al.* (2020) [5] с допущением двух распределений для моделирования СИ в связи с тем, что R_0 , вычисленный из дельта-распределенного серийного интервала, считается наиболее консервативной оценкой, в то время как R_0 из экспоненциально распределенного СИ может считаться «средней» оценкой [3]. От величины R_0 зависят такие прогностические эпидемиологические показатели, как ожидаемый естественный размер эпидемии (*epidemic final size*) и порог коллективного иммунитета (*herd immunity threshold*), которые вычисляли по Miller J.C. (2012) и P. Rodpothong, P. Auewarakul (2012) соответственно [6, 7]. Оценку R_t проводили по методике A. Cori *et al.* (2013) на основе количества выявленных случаев COVID-19 за прошедшие 7 дней [8]. В целом показатели репродукции выше 1 свидетельствуют о наличии (сохранении) потенциала инфекционного заболевания к эпидемическому распространению в конкретной популяции, в то время как показатели репродукции меньше 1 – об отсутствии такого потенциала [3]. Ретроспективные данные о количестве зарегистрированных экстренных извещений с установленным диагнозом «внебольничная пневмония» за 2017–2019 гг., а также оперативные данные подвергнуты регрессионному анализу с помощью множественной регрессии, в которой сезонный компонент задавался синусоидальной функцией [9]. Обработка данных выполнена с использованием MS Excel 2010. Построение картограммы проводили в приложении QGIS 3.12-Bukuresti в географической системе координат EPSG: 3576.

Результаты и обсуждение

За период с 27 марта по 10 сентября 2020 г. на территории Омской области зарегистрировано 9779 случаев COVID-19, из которых 235 завершились летальным исходом и 7890 – выздоровлением. Распространение COVID-19 по территории области началось с семейного кластера из трех завозных случаев из Объединенных Арабских Эмиратов, а к концу анализируемого периода выявлено 167 завозных случаев COVID-19. Местная передача отмечена немногим позднее: 30 марта выявлен кластер из 3 заболевших, не имевших в анамнезе выездов с территории области. Экспоненциальный темп прироста кумулятивного количества случаев COVID-19 за период с 27 марта по 10 сентября 2020 г. составлял 4,5 % в сутки.

Первый летальный исход у пациента с COVID-19 зарегистрирован 24 апреля (4-я неделя от

начала эпидемии). Оперативные оценки летальности, произведенные на основе завершённых случаев COVID-19, в мае (7-я неделя) достигали 13,7 %, а на основе выявленных случаев – 3,1 %. К июлю (к 14-й неделе) оба показателя относительно стабилизировались на уровне 1,5 и 0,9 % соответственно. Однако с начала августа (18-я неделя) отмечается неуклонный рост обоих показателей летальности, которые к 10 сентября (24-я неделя) достигли 2,89 и 2,40 % соответственно.

Территориальное распределение случаев COVID-19 по состоянию на 10.09.2020 характеризовалось выраженной неравномерностью: 75,7 % (7400/9779) случаев выявлено в г. Омске, 4,5 % (436/9779) – в Омском, 2,0 % (195/9779) – в Калачинском, 2,0 % (193/9779) – в Москаленском, 1,4 % (141/9779) – в Азовском немецком национальном, 1,5 % (144/9779) – в Марьяновском, 1,1 % (112/9779) – в Нововаршавском муниципальных районах. На остальные районы приходилось менее 1 % выявленных случаев. К концу анализируемого периода в областной структуре заболеваний COVID-19 отмечено снижение на 2 % доли случаев, зарегистрированных в Омске, что свидетельствует об активизации эпидемического процесса в районах области.

Кумулятивный показатель заболеваемости COVID-19 населения Омской области на 10.09.2020 составил 507,6 (95 % ДИ 497,5÷517,6) на 100 тыс. населения и был превышен в г. Омске – 641,0 (95 % ДИ 626,4÷655,6) и четырех районах области: Москаленском – 693,8 (95 % ДИ 596,0÷791,7) на 100 тыс. населения, Азовском немецком национальном – 551,4 (95 % ДИ 460,4÷642,4) на 100 тыс. населения, Марьяновском – 536,9 (95 % ДИ 449,2÷624,6) на 100 тыс. населения, Нововаршавском – 509,3 (95 % ДИ 415,0÷603,6) на 100 тыс. населения. Из 32 муниципальных районов области более высокими показателями заболеваемости характеризуется ряд территорий, по которым движется железнодорожный транспорт между западной и восточной границами области и между южной границей области и г. Омском (рис. 1). В прилегающих к Омской области регионах России и Казахстана на 10.09.2020 отмечены следующие показатели заболеваемости населения COVID-19: Новосибирская область – 426,7^{0/0000} (95 % ДИ 419,1÷434,4), Томская область – 574,7^{0/0000} (95 % ДИ 560,4÷589,0), Тюменская область – 537,1^{0/0000} (95 % ДИ 525,5÷548,7), Северо-Казахстанская область – 721,3^{0/0000} (95 % ДИ 699,0÷743,7), Павлодарская область – 512,8^{0/0000} (95 % ДИ 496,7÷529,0).

В результате анализа структуры заболевших COVID-19 по полу и возрасту установлено, что за анализируемый период на долю мужчин пришлось 43,8 % (4276/9762) случаев, по которым имелась соответствующая информация. Медианный возраст заразившихся COVID-19 мужчин составил 50 (35; 63) лет, женщин – 54 (38; 65) года соответственно.

Распределение больных COVID-19 по возрасту и полу за анализируемый период отличалось от по-

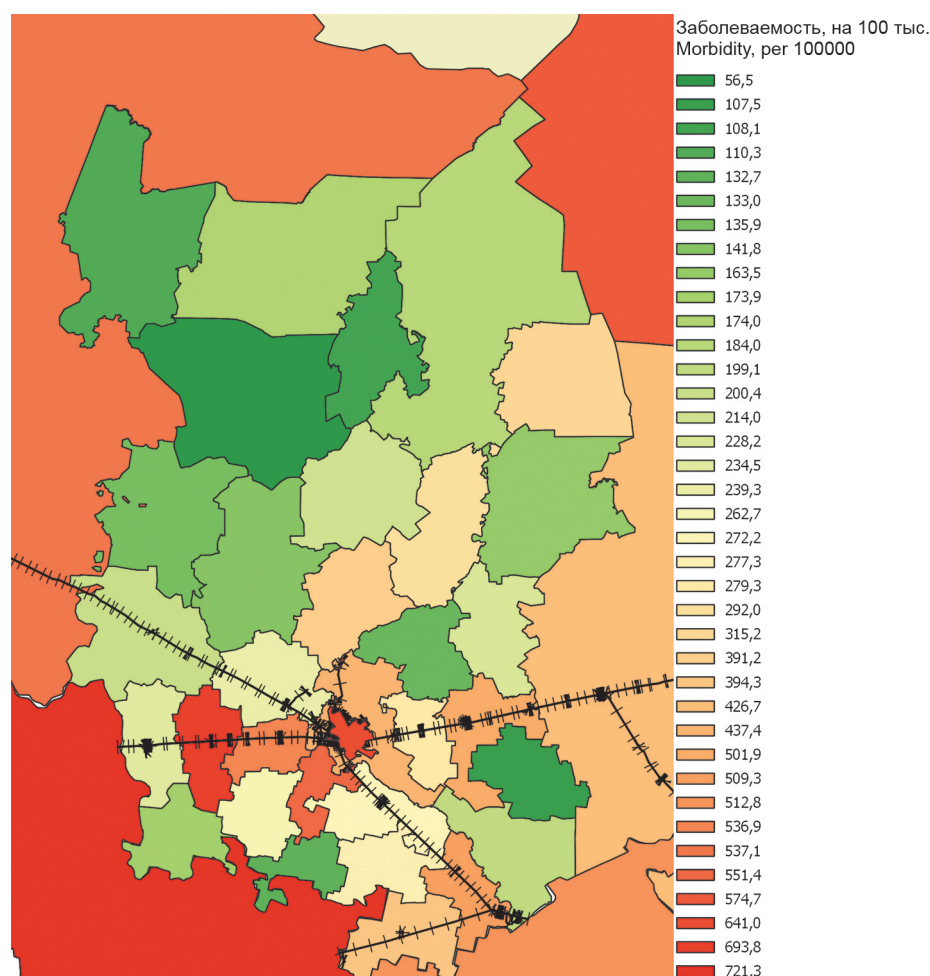


Рис. 1. Территориальное распределение заболеваемости COVID-19 населения Омской области на 10.09.2020 (показатели на 100 тыс. населения соответствующей территории)

Fig. 1. Spatial distribution of COVID-19 morbidity in Omsk Region as of 10.09.20 (per 100000 pop.)

ловозрастной структуры населения Омской области (рис. 2). Так, удельный вес лиц молодого возраста (до 19 лет включительно) в структуре случаев COVID-19 составлял 5,8 и 3,5 % против 25,9 и 21,2 % для мужчин и женщин соответственно в структуре всего населения, что свидетельствует об относительно малой вовлеченности указанных возрастных групп в эпидемический процесс COVID-19 на территории Омской области. Возможным объяснением является своевременное закрытие детских дошкольных учреждений и перевод образовательных учреждений на удаленный режим работы, что привело к разобщению коллективов несовершеннолетних жителей Омской области и затруднило их заражение. С этим согласуется и несколько меньший удельный вес возрастных групп «20–29 лет» в структуре случаев COVID-19, составивший 10,0 и 7,8 % против 12,4 и 10,2 % для мужчин и женщин соответственно, что может быть так же связано с переводом колледжей и вузов на удаленный режим работы.

Наиболее вовлеченными в эпидемический процесс среди мужского населения оказались возрастные группы «45 лет и старше» (58,8 % в структуре заболевших COVID-19 против 36,7 % в общей численности), среди женского – «35 лет и старше» (81,8 % в структуре заболевших COVID-19 против 60,9 % в общей численности). Доля возрастных групп «55–69 лет» у мужчин и «50–69 лет» у женщин в структуре

случаев COVID-19 особенно значима: она составила 30,1 и 40,4 % против 19,8 и 28,0 % соответственно в структуре всего населения области.

Структура клинических форм среди вновь выявляемых случаев COVID-19 на протяжении анализируемого периода наблюдения претерпевала ряд изменений. В течение первых недель эпидемии, когда число новых случаев было менее или равно 10–20 за неделю, преобладали бессимптомные формы или заболевания с клиникой ОРВИ. По мере увеличения количества новых случаев COVID-19 доля «ковидных» ОРВИ снижалась и, начиная с 7-й недели эпидемии (с 11 по 17 мая), как правило, не превышала 10 % среди всех выявленных за неделю. Удельный вес бессимптомных форм, составляя 60–70 % в период с 5-й по 8-ю неделю (с 27 апреля по 24 мая), затем опустился ниже 50 %, достигнув 30,6 % на 12-й неделе (с 15 по 21 июня) от начала эпидемии. К 16-й неделе (с 13 по 19 июля) доля бессимптомных форм увеличилась до 49,2 %, после чего постепенно снижалась до 15,5 % на 23-й неделе эпидемии (с 31 августа по 6 сентября). В последнюю неделю анализируемого периода (с 7 по 13 сентября) удельный вес бессимптомных на момент выявления форм COVID-19 резко вырос до 54,3 %.

В полном соответствии с колебаниями доли бессимптомных форм происходили изменения удельного веса «ковидных» пневмоний. На 9-й неделе

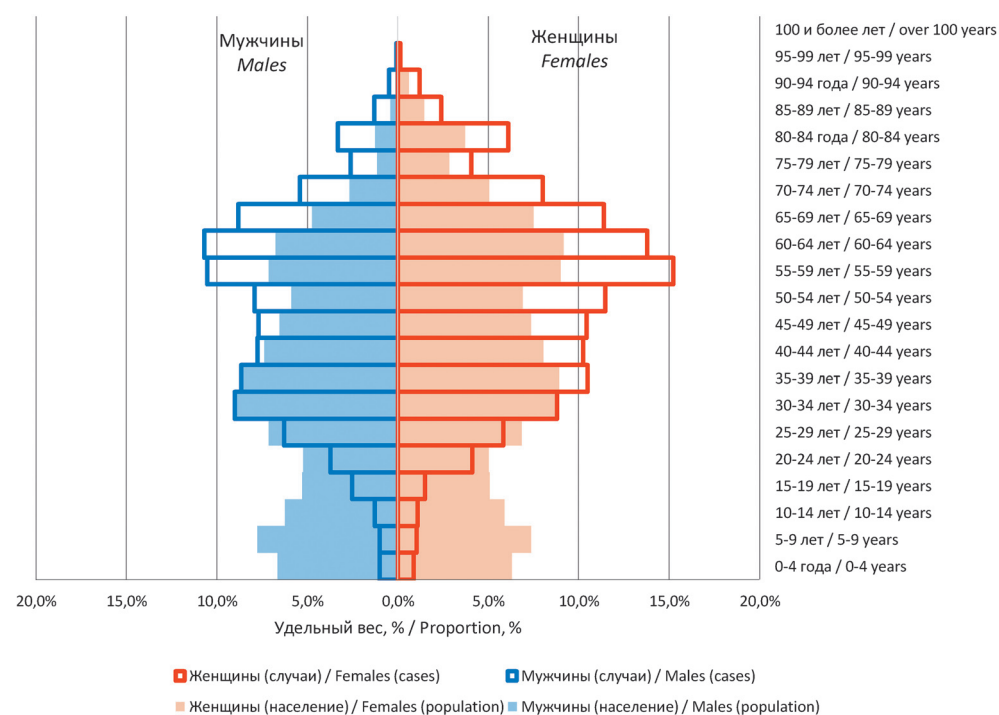


Рис. 2. Распределение случаев COVID-19 в Омской области по полу и возрасту в период с 27 марта по 10 сентября 2020 г. в сравнении с половозрастной структурой населения (%)

Fig. 2. Age and sex distribution of COVID-19 cases compared to age and sex distribution of population in Omsk Region during 27.03.20–10.09.20 (%)

(с 25 по 31 мая) доля пневмоний среди всех случаев COVID-19 выросла с 20,0–25,0 % практически в 2 раза (до 46,7 %) и продолжала увеличиваться до 61,5 % на 12-й неделе (с 15 по 21 июня), затем к 16-й неделе (с 13 по 19 июля) постепенно уменьшалась до 43,6 %, после чего начала расти, достигнув 70,6 % на 23-й неделе эпидемии (с 31 августа по 6 сентября). В среднем доля пневмоний в структуре COVID-19 за весь период наблюдения составила 43,8 %.

На рис. 3 представлена сглаженная кривая среднелетней внутригодовой динамики эпидемического процесса внебольничных пневмоний в Омской

области в 2017–2019 гг. (черная линия) в сопоставлении с оперативными данными за 2020 г., начиная с 5-й недели эпидемии (с 27 апреля по 3 мая), после которой отмечается расхождение многолетней тенденции с данными текущего года. Вместо ожидаемого снижения наблюдается быстрый неуклонный рост среднего количества экстренных извещений (ЭИ), поданных за неделю, по которым окончательным диагнозом указана «внебольничная пневмония» (ВБП), что не удается объяснить регистрируемыми случаями пневмоний, верифицированных как COVID-19. Это свидетельствует о неполном выявлении «ковидных»

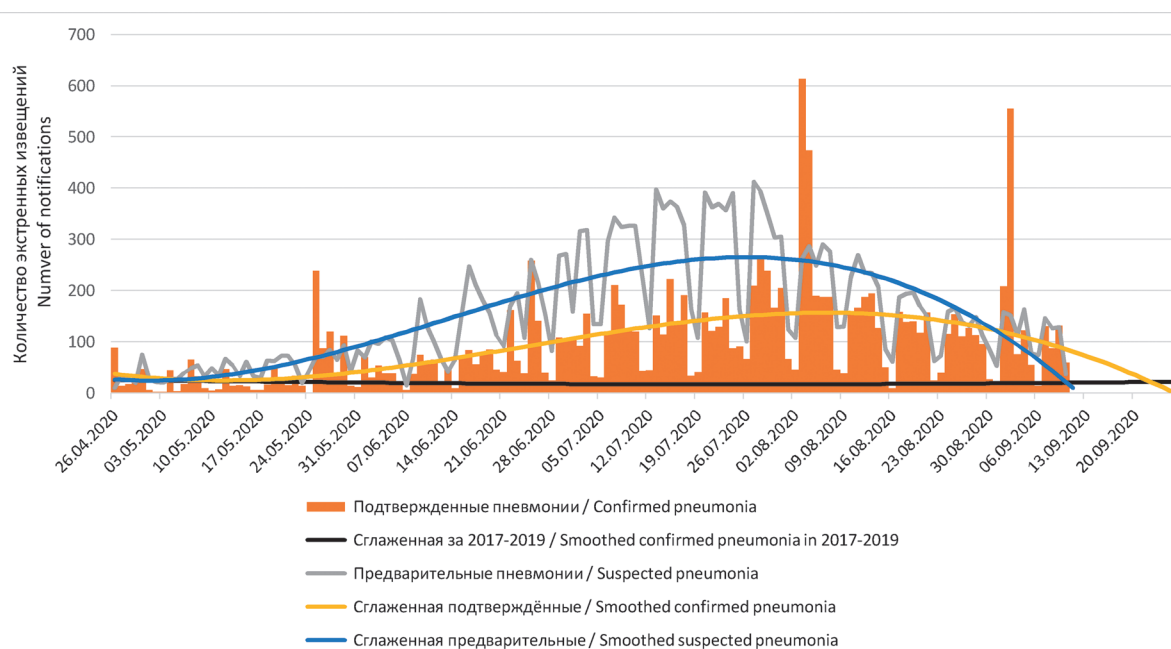


Рис. 3. Внутригодовая динамика регистрации случаев внебольничных пневмоний в 2020 г. в сравнении со среднелетними показателями за 2017–2019 гг. в Омской области (абс. по неделям)

Fig. 3. Seasonality of pneumonia cases in Omsk Region in 2020 by week compared to 2017–2019 average (abs.)

пневмоний. На 18-й неделе эпидемии (с 27 июля по 2 августа) подтверждено 1200 случаев ВБП против 120 в этот же период в 2017–2019 гг., на 19-й неделе эпидемии (3–9 августа) – 1736 против 121, на 20-й неделе (10–16 августа) – 890 против 123, а к концу анализируемого периода (4–10 сентября, 24-я неделя от начала эпидемии) – 600 подтвержденных случаев ВБП против 138 среднестатистических.

Для оценки динамики распространения COVID-19 в Омской области в сравнении с Москвой и Московской областью построен график кумулятивного числа случаев (по данным ресурса «стопкоронавирус.рф»). Данные по регионам совмещены во времени по дате регистрации в регионе первых 100 случаев. Для обеспечения наглядности на графике представлены опорные линии, отмечающие удвоение числа случаев каждые пять, семь и десять дней (рис. 4). Чем сильнее на графике кривая «изгибается» к горизонту, тем медленнее развивается эпидемический процесс: выраженный изгиб заметен на кривых столичного региона, в то время как кривая Омской области имеет менее выраженный изгиб, что отражает значительно меньшую скорость снижения трансмиссии COVID-19. Вместе с тем увеличение времени удвоения количества случаев с 7 до 10 дней в Омской области отмечено после 26-го дня от точки отсчета, а в Москве – намного позже (78-й день после регистрации первых 100 случаев). Среди возможных объяснений причин выявленных различий в характере логарифмических кривых – более раннее относительно начала распространения COVID-19 введение ограничительных мероприятий, но их менее жесткий характер в Омской области по сравнению с Москвой.

Величины базового показателя репродукции, вычисленные на основе экспоненциального темпа прироста кумулятивного числа случаев COVID-19 в течение раннего периода распространения инфекции в Омской области, составили 1,5 и 1,4 при дельта- и экспоненциально распределенном серийном интерва-

ле соответственно. Обе эти оценки свидетельствуют о наличии потенциала COVID-19 к распространению на территории Омской области. Ожидаемый размах эпидемии в случае продолжения действия ограничительных мер может быть в пределах от 50,8 до 58,0 % зараженного населения, а порог коллективного иммунитета – от 28,6 до 33,3 % соответственно. В условиях изменяющейся интенсивности противоэпидемических мероприятий реальный размах эпидемии может быть иным. Так, по оценкам ВОЗ [10], базовый показатель репродукции COVID-19 значительно выше $2,0 \div 2,5$. Таким образом, при отсутствии проводимых в Омской области противоэпидемических мероприятий ожидаемый естественный размах эпидемии мог бы составить от 79,7 до 89,3 % зараженного населения, а порог коллективного иммунитета – от 50,0 до 60,0 % соответственно.

Средняя оценка R_t на протяжении периода наблюдения составила 1,10, варьируя от 0,69 до 1,99 (рис. 5), что в целом наглядно демонстрирует существенно, но недостаточно подавляемый системой эпидемиологического надзора потенциал COVID-19 к распространению среди населения Омской области.

Таким образом, на фоне проводимых противоэпидемических мероприятий в период с 27 марта по 10 сентября 2020 г. экспоненциальный темп прироста кумулятивного количества случаев COVID-19 составлял 4,5 % в сутки, базовый показатель репродукции (R_0) – 1,4–1,5, эффективный показатель репродукции (R_t) – 1,10, порог коллективного иммунитета – 28,6 %. Ожидаемый размах эпидемии в случае продолжения сдерживания эпидемического процесса может достигнуть 58,0 % переболевшего населения. Фактически после подъема заболеваемости минимальный суточный прирост числа случаев (15 случаев) отмечен на 22-й неделе эпидемии – 25 августа, что можно считать условной границей эпидемического цикла. В целом за цикл от начала регистрации до 26 августа было зарегистрировано 9085 случаев, или 0,47 % пораженного населения, что соответству-

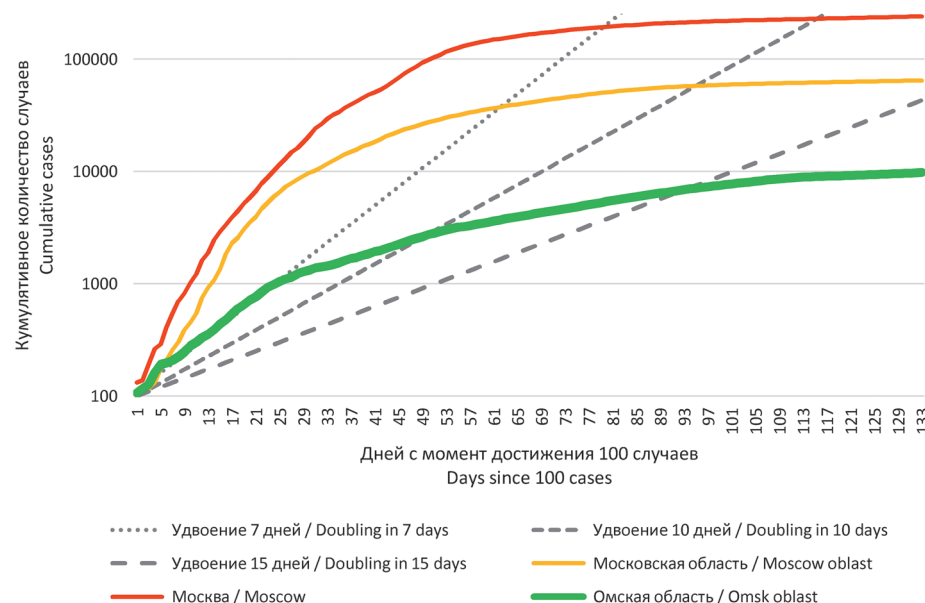


Рис. 4. Динамика роста кумулятивного количества заболевших COVID-19, совмещение на дату регистрации 100 случаев (абс., логарифмическая шкала)

Fig. 4. Cumulative counts of COVID-19 cases, curves combined at 100 cases (abs. log scale)

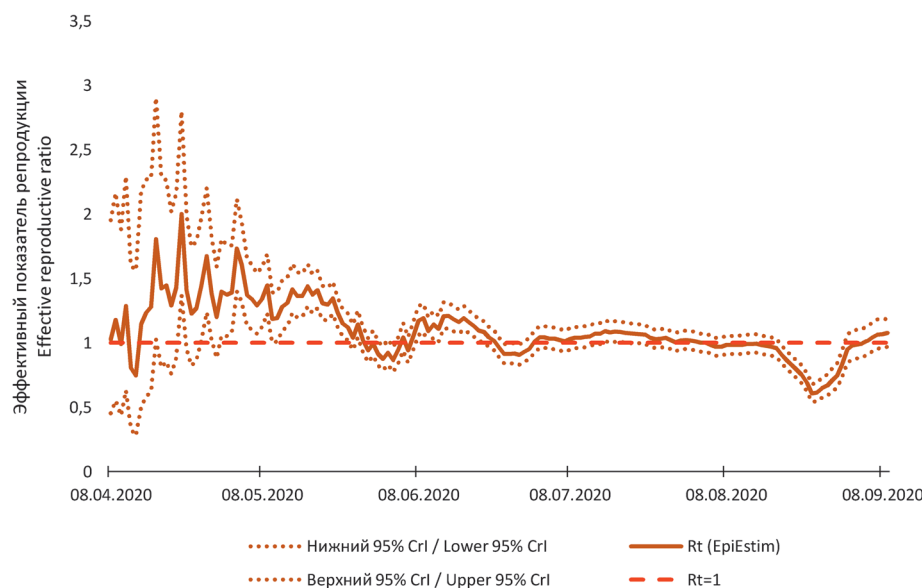


Рис. 5. Оперативная оценка эффективного показателя репродукции COVID-19 в Омской области в период с 8 апреля по 10 сентября 2020 г.

Fig. 5. Time-varying reproduction ratio of COVID-19 in Omsk Region during 08.04.20–10.09.20

ет базовому показателю репродукции 1,00236, свидетельствующему об эффективности проводившихся мероприятий.

Потенциал COVID-19 к распространению среди населения Омской области подавлен недостаточно. Уменьшение количества выявляемых вирусоносителей и неполное выявление COVID-19 среди заболевших внебольничными пневмониями создают дополнительные риски для скрытого распространения инфекции и осложнения эпидемической ситуации. Сохранение ограничительных мероприятий и превышение порога коллективного иммунитета (28,6 % населения) позволит значительно снизить риски усиления распространения COVID-19 в Омской области.

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

References / Список литературы

1. WHO. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID19 – 11 March 2020. (Cited 29.07.20) [Internet]. Available from: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
2. WHO. Coronavirus disease (COVID-19). Dashboard. (Cited 13.09.20) [Internet]. Available from: <https://covid19.who.int/table?tableDay=yesterday&tableChartType=heat>.
3. Wallinga J., Lipsitch M. How generation intervals shape the relationship between growth rates and reproductive numbers. *Proc. Biol. Sci.* 2007; 274(1609):599–604. DOI: 10.1098/rspb.2006.3754.
4. Nishiura H., Linton N.M., Akhmetzhanov A.R. Serial interval of novel coronavirus (COVID-19) infections. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 93:284–6. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.02.060.
5. Park M., Cook A.R., Lim J.T., Sun Y., Dickens B.L. A systematic review of COVID-19 epidemiology based on current evidence. *J. Clin. Med.* 2020; 9(4):967. DOI: 10.3390/jcm9040967.
6. Miller J.C. A note on the derivation of epidemic final sizes. *Bull. Math. Biol.* 2012; 74(9):2125–41. DOI: 10.1007/s11538-012-9749-6.

7. Rodpothong P., Auewarakul P. Viral evolution and transmission effectiveness. *World J. Virol.* 2012; 1(5):131–4. DOI: 10.5501/wjv.v1.i5.131.

8. Cori A., Ferguson N.M., Fraser C., Cauchemez S. A new framework and software to estimate time-varying reproduction numbers during epidemics. *Am. J. Epidemiol.* 2013; 178(9):1505–12. DOI: 10.1093/aje/kwt133.

9. Stolwijk A.M., Straatman H., Zielhuis G.A. Studying seasonality by using sine and cosine functions in regression analysis. *J. Epidemiol. Community Health.* 1999; 53(4):235–8. DOI: 10.1136/jech.53.4.235.

10. WHO. Coronavirus disease (COVID-19). Situation Report – 46. (Cited 29.07.20) [Internet]. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20200306-sitrep-46-covid-19.pdf?sfvrsn=96b04adf_4.

Authors:

Blokh A.I., Pen'yevskaya N.A., Rudakov N.V. Omsk Research Institute of Natural Focal Infections; 7, Prospect Mira, Omsk, 644080, Russian Federation; e-mail: mail@oniipi.org. Omsk State Medical University; 12, Lenin St., Omsk, 644099, Russian Federation.

Lazarev I.I. Omsk State Medical University. 12, Lenin St., Omsk, 644099, Russian Federation. E-mail: novikovai@omsk-osma.ru.

Mikhailova O.A., Fedorov A.S. Center for Hygiene and Epidemiology in Omsk region. 42A, 27th Severnaya St., Omsk, 644116, Russian Federation. E-mail: epid@mail.omsksanepid.ru.

Pnevskii Y.A. Rospotrebnadzor Administration in Omsk Region. 98, 10 let Oktyabrya St., Omsk, 644001, Russian Federation. E-mail: pnevski@yandex.ru

Об авторах:

Блох А.И., Пен'евская Н.А., Рудаков Н.В. Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций; Российская Федерация, 644080, Омск, Проспект Мира, 7; e-mail: mail@oniipi.org. Омский государственный медицинский университет; Российская Федерация, 644099, Омск, ул. Ленина, 12.

Лазарев И.И. Омский государственный медицинский университет. Российская Федерация, 644099, Омск, ул. Ленина, 12. E-mail: novikovai@omsk-osma.ru.

Михайлова О.А., Федоров А.С. Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области. Российская Федерация, 644116, Омск, ул. 27-я Северная, 42А. E-mail: epid@mail.omsksanepid.ru.

Пневский Ю.А. Управление Роспотребнадзора по Омской области. Российская Федерация, 644001, Омск, ул. 10 лет Октября, 98. E-mail: pnevski@yandex.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-43-49

УДК 616.98:578.2

А.П. Бондаренко, В.А. Шмыленко, О.Е. Троценко, В.О. Котова, Л.В. Бутакова,
Е.А. Базыкина

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ПРОБ МОКРОТЫ БОЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЕЙ В ХАБАРОВСКЕ И ХАБАРОВСКОМ КРАЕ В НАЧАЛЬНЫЙ ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19 (МАЙ–ИЮНЬ 2020 г.)

ФБУН «Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»,
Хабаровск, Российская Федерация

Цель исследования: изучить бактериальную микрофлору в мокроте больных пневмонией, вызванной SARS-CoV-2 или другими возбудителями. **Материалы и методы.** Исследовали бактериальную микрофлору мокроты 173 больных пневмонией, госпитализированных в лечебные учреждения г. Хабаровска и Хабаровского края в мае–июне 2020 г. Бактериологический анализ мокроты проводили с использованием дифференциально-диагностических сред, идентификацию выделенных патогенов – с помощью микробиологического анализатора Vitec 2 Compact. Выявление РНК вируса SARS-CoV-2 проводили методом ПЦР с тест-системой «Вектор-ПЦР_{РВ}-2019-nCoV-RG» (производство ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово). Определение ДНК возбудителей микоплазмоза и хламидиоза проводили с тест-системой «АмплиСенс® Mycoplasma pneumoniae/Chlamydia pneumoniae» (производство ФБУН ЦНИИЭ). Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы Excel. **Результаты и обсуждение.** Обе группы больных (Covid-19+ и Covid-19–) характеризуются высоким уровнем выделения бактериальной флоры (81,4 и 74,7 %), в том числе обычных возбудителей внебольничных пневмоний, существенной частотой выделения грибов рода *Candida* и микробных ассоциаций. Группа больных Covid-19+ характеризуется более широким спектром возбудителей, выявлением полирезистентных грамотрицательных энтеробактерий, грамотрицательных неферментирующих полирезистентных бактерий, более выраженным проявлением микробных ассоциаций. В группе наблюдения Covid-19– лекарственно устойчивая флора представлена в основном стафилококками групп MRSA, MRSE.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, возбудители, группы наблюдения Covid-19+ и Covid-19–, мокрота, бактериальная микрофлора.

Корреспондирующий автор: Бондаренко Альбина Павловна, e-mail: baklabhniem@gmail.com.

Для цитирования: Бондаренко А.П., Шмыленко В.А., Троценко О.Е., Котова В.О., Бутакова Л.В., Базыкина Е.А. Характеристика бактериальной микрофлоры, выделенной из проб мокроты больных пневмонией в Хабаровске и Хабаровском крае в начальный период пандемии COVID-19 (май–июнь 2020 г.). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:43–49. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-43-49

Поступила 14.09.20. Принята к публ. 16.09.20.

A.P. Bondarenko, V.A. Shmylenko, O.E. Trotsenko, V.O. Kotova, L.V. Butakova, E.A. Bazykina

Characteristics of Bacterial Microflora Isolated from Sputum of Patients with Pneumonia Registered in Khabarovsk City and Khabarovsk Territory in the Initial Period of COVID-19 Pandemic in May–June, 2020

Khabarovsk Research Institute of Microbiology and Epidemiology, Khabarovsk, Russian Federation

Abstract. Objective: to study the bacterial microflora in the sputum of patients with pneumonia caused by SARS-CoV-2 or other pathogens. **Materials and methods.** The bacterial microflora of sputum of 173 patients with pneumonia admitted to hospitals in Khabarovsk and the Khabarovsk Territory in May – June 2020 was examined. Detection of RNA of the SARS-CoV-2 virus was carried out by PCR with the Vector-PCR-RV-2019-nCoV-RG test system (manufactured by the State Scientific Center of VB “Vector”, Koltsovo). Determination of the DNA of mycoplasmosis agents and chlamydia was carried out with the test system “AmpliSens® Mycoplasma pneumoniae/Chlamydia pneumoniae” (manufactured by CRIE). Statistical data processing was performed using the Excel program. **Results and discussion.** Both groups of patients (Covid-19+ and Covid-19–) had high levels of bacterial flora isolation (81.4 and 74.7 %) including common pathogens for community-acquired pneumonia as well as notable detection frequency of *Candida* spp. and microbial associations. The group of Covid-19+ patients demonstrated a wider range of detected pathogens, was positive for poly-resistant gram-negative *Enterobacteriaceae*, non-fermenting gram-negative poly-resistant bacteria, with more expressed manifestation of microbial associations. In the group of Covid-19– participants drug-resistant microflora was presented only by MRSA and MRSE staphylococci.

Key words: community-acquired pneumonia, etiological agents, groups under observation Covid-19+ and Covid-19–, sputum, bacterial microflora.

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

Corresponding author: Albina P. Bondarenko, e-mail: baklabhniem@gmail.com.

Citation: Bondarenko A.P., Shmylenko V.A., Trotsenko O.E., Kotova V.O., Butakova L.V., Bazykina E.A. Characteristics of Bacterial Microflora Isolated from Sputum of Patients with Pneumonia Registered in Khabarovsk City and Khabarovsk Territory in the Initial Period of COVID-19 Pandemic in May–June, 2020. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:43–49. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-43-49

Received 14.09.20. Accepted 16.09.20.

Bondarenko A.P., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9197-8519>
Shmylenko V.A., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7170-3032>
Trotsenko O.E., ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3050-4472>
Kotova V.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9824-7025>
Butakova L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7238-3691>
Bazykina E.A., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5695-6752>

Актуальной проблемой здравоохранения является внебольничная пневмония (ВП) – одна из ведущих причин заболеваемости, госпитализации и смертности населения. По данным литературы, *Streptococcus pneumoniae* считается доминирующим этиологическим агентом пневмоний, вызывая от 50 до 80 % случаев заболеваний у лиц всех возрастных групп [1]. Однако, по последним сведениям, частота обнаружения *S. pneumoniae* при ВП варьирует в пределах от 5 до 35 %. Такой разброс в показателях можно объяснить трудностями в получении качественных образцов мокроты из нижних отделов дыхательных путей, различиями в чувствительности применяемых диагностических сред и тестов, использованием антимикробных препаратов (АМП) для лечения заболевания до проведения этиологической диагностики [2].

Среди других типичных бактериальных возбудителей ВП заметная роль принадлежит *Haemophilus influenzae*, грамотрицательным микроорганизмам семейства энтеробактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и др.), неферментирующим грамотрицательным бактериям (НГОБ – *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* и др.), *Staphylococcus spp.* В последние годы значительно чаще в качестве возбудителей выявляются микроорганизмы – внутриклеточные паразиты (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*).

МКБ-10 выделяет пневмонии, вызванные вирусами гриппа, парагриппа, аденовирусами. Чаще у детей при пневмонии выявляют смешанную бактериально-вирусную инфекцию с участием большой группы респираторных вирусов: респираторно-синциального, метапневмовируса, бокавируса, риновирусов.

С начала пандемии в России развернута сеть новых инфекционных стационаров, которые, по определению Ch. Brun-Busson, представляют собой особую экологическую нишу, где группируются ослабленные больные и применяются инвазивные методы лечения [3]. По современной терминологии, новые инфекционные госпитали относятся к учреждениям высокого эпидемиологического риска инфицирования [4].

В настоящее время накоплены данные по проблеме обеспечения эпидемиологической безопасности больничной среды, связанные с глобальным распространением мультирезистентных бактерий, а также с интенсивным развитием медицинских лечебных технологий. В частности, искусственная вентиляция легких (ИВЛ) приводит к развитию вентилятор-ассоциированных заболеваний с присоединением различных вариантов коинфицирования [4, 5].

Известно, что процесс формирования госпи-

тальных клонов возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), представляет собой многоступенчатый эволюционный процесс, в котором выживание и накопление возбудителя имеет существенное значение. Безусловно, в процессе селекции госпитальных мультирезистентных клонов основная роль принадлежит пассажу возбудителя через организм пациентов [6]. Больничная среда может играть роль резервуара инфекции [7].

По данным последних научных публикаций, бактериальное коинфицирование пациентов, больных пневмонией новой коронавирусной этиологии, в целом развивается в 7 % случаев. Однако показано, что у пациентов с наличием SARS-CoV-2, находящихся в отделениях интенсивной терапии, бактериальная коинфекция развивалась в 3,5 раза чаще, чем у больных, получающих лечение в других общих отделениях. Среди патогенов, выявляемых при коинфекции, отмечены *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Aspergillus spp.* и др., что определяет необходимость уделять внимание не только диагностике COVID-19, но и выявлению других патогенов для улучшения исхода заболевания [8–13]. Сочетанное инфицирование синегнойной палочкой, патогенными грибами косвенно указывает на значительный вклад внутрибольничного инфицирования вследствие длительной госпитализации пациентов с SARS-CoV-2 [14, 15].

Внедрение в лабораторную микробиологическую практику новых методов исследования, в частности все более широкое использование бактериологического анализатора Vitec 2 Compact, масс-спектрометра значительно увеличивает диагностические возможности лабораторий, что особенно важно для характеристики микробных ассоциаций, влияющих на патологическое состояние пациента и коррелирующих с тяжестью течения заболеваний [16].

Цель исследования – представить характеристику бактериальной микрофлоры, выявленной в мокроте двух групп пациентов, больных пневмонией (Covid-19+ и Covid-19–), в г. Хабаровске и Хабаровском крае в начальный период пандемии нового коронавируса в мае–июне 2020 г.

Материалы и методы

Обследованы 173 больных пневмонией, госпитализированных в лечебные учреждения г. Хабаровска и Хабаровского края в мае–июне 2020 г.

С учетом отдаленности районных больниц клинические образцы мокроты больных доставляли для исследования в течение 2–24 ч после забора материала. Больных обследовали в разные сроки с момента заболевания и/или госпитализации (с 1-го по 20-й

день), так как целями диагностики являлись не только определение этиологии болезни, но и контроль эффективности лечения в ходе заболевания.

Исследование проводили в соответствии с МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний», МР 4.2.0114-16 «Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии», а также согласно Приказу от 22.04.1985 № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».

Выявление РНК вируса SARS-CoV-2 проводили методом ПЦР с тест-системой «Вектор-ПЦР_{РВ}-2019-nCoV-RG» (производство ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово). Определение ДНК возбудителей микоплазмоза и хламидиоза проводили с тест-системой «АмплиСенс® Mycoplasma pneumoniae/Chlamydophila pneumonia» (производство ФБУН ЦНИИЭ). Бактериологическое исследование проводили классическим количественным методом с разведением мокроты до титра 10^{-7} и высевом на дифференциально-диагностические среды, обеспечивающие рост основных бактериальных патогенов. Для выявления прихотливых микроорганизмов (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Streptococcus spp.*) применяли агар с дефибринированной кровью барана (5 %), обогащенный лошадиной сывороткой (3,5 %), и шоколадный агар с термостатированием посевов в CO_2 -инкубаторе. Идентификацию выделенных патогенов проводили с использованием микробиологического анализатора Vitec 2 Compact. Антибиотикорезистентность определяли диско-диффузионным методом с интерпретацией результатов в соответствии с рекомендациями EUCAST (версия 8.0) и в необходимых случаях – с использованием микробиологического анализатора Vitec 2 Compact.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы Excel: проводили расчет средних значений удельного веса выделенных в ходе исследования возбудителей (M) и ошибки средней величины (m).

Результаты и обсуждение

РНК вируса SARS-CoV-2 выявлена в 86 из 173 исследованных образцов ($49,7 \pm 3,8$ %). ДНК хламидий и микоплазм не выявлены. Далее проведен сопоставительный анализ результатов бактериологического исследования двух групп клинических образцов мокроты: 1-я группа: 86 проб мокроты, в которых методом ПЦР обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2 (Covid-19+); 2-я группа: 87 образцов мокроты, в которых РНК коронавируса SARS-CoV-2 не обнаружена (Covid-19–).

Возрастной состав двух групп пациентов, больных пневмонией (Covid-19+, N=86 и Covid-19–, N=87) и прошедших бактериологическое обследование, представлен в табл. 1.

Следует отметить, что возрастная группа «65 лет и старше» преобладала среди пациентов первой группы наблюдения ($45,4 \pm 5,4$ и $36,8 \pm 5,2$ %).

Результаты исследования бактериальной флоры в мокроте больных двух групп наблюдения представлены в табл. 2.

Видовой состав грибов рода *Candida*, выделенных из мокроты больных, представлен в табл. 3.

Для 1-й группы больных характерно участие микробных ассоциаций в составе микрофлоры мокроты (табл. 4). Грибы рода *Candida* входили в состав всех грибково-бактериальных ассоциаций.

Микробные ассоциации во 2-й группе выявлялись реже, чем в 1-й группе проб ($26,2 \pm 5,5$ % против $35,7 \pm 5,7$ %), в том числе двух- и трехкомпонентные ($23,1 \pm 5,2$ и $3,1 \pm 2,1$ %). Как показал проведенный анализ, выявленная закономерность связана с различиями в возрастном составе наблюдаемых групп больных. А именно: ассоциации в большей степени характерны для образцов мокроты возрастной группы больных «65 лет и старше», которая и преобладает среди пациентов 1-й группы обследования (Covid-19+).

В целом для второй группы (Covid-19–) характерны более узкий спектр возбудителей, отсутствие регистрации полирезистентных к АМП грамотрицательных бактерий и НГОБ, меньшая доля участия микробных ассоциаций на данном этапе наблюдения.

Таблица 1 / Table 1

Возрастной состав двух групп пациентов, больных пневмонией
Age distribution of two patient groups with community-acquired pneumonia

Возрастные группы Age groups	Всего Total	1-я группа Covid-19+ (N=86) 1 st group Covid-19+ (N=86)		2-я группа Covid-19– (N=87) 2 nd group Covid-19– (N=87)	
		абс. число abs. number	%	абс. число abs. number	%
20–50	49	24	$27,9 \pm 4,8$	25	$28,7 \pm 4,8$
51–64	53	23	$26,7 \pm 4,7$	30	$34,5 \pm 5,1$
65 и старше 65 and over	71	39	$45,4 \pm 5,4$	32	$36,8 \pm 5,2$
Итого: Total:	173	86	100	87	100

Таблица 2 / Table 2

Результаты исследования бактериальной флоры, выявленной в мокроте
Results of the evaluation of bacterial microflora isolated from sputum

Возбудители Pathogens	1-я группа Covid-19+ (N=86) 1 st group Covid-19+ (N=86)		2-я группа Covid-19- (N=87) 2 nd group Covid-19- (N=87)	
	абс. число abs.	%	абс. число abs.	%
<i>S. pneumoniae</i>	2	2,3±1,6	3	3,6±1,9
<i>Klebsiella</i> spp., в т.ч. продуценты БЛРС <i>Klebsiella</i> spp. including ESBL producers	10 3	11,6±3,5 3,6±2,0	10 -	11,5±3,4 -
Прочие энтеробактерии Other <i>Enterobacteriaceae</i>	4	4,6±2,3	4	4,6±2,2
НГОВ*, в т.ч. полирезистентные GNNB*, including poly-resistant strains	10 4	11,6±3,5 4,7±2,3	6 -	6,9±2,7 -
<i>Staphylococcus</i> spp., в т.ч. <i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus</i> spp. including <i>S. aureus</i>	15 4	17,4±4,1 4,7±2,3	8 1	9,2±3,1 1,1±1,1
- <i>S. aureus</i> (MRSA)	4	4,7±2,3	2	2,3±1,6
- <i>S. epidermidis</i> (MRSE)	2	2,3±1,6	3	3,5±2,0
- КНС** полирезистентные - CNS** poly-resistant	1	1,2±1,17	2	2,3±1,6
- КНС - CNS	4	4,7±2,3	-	-
<i>Candida</i> , в т.ч. моноинфекция <i>Candida</i> including mono-infection	56 33	65,1±5,1 38,4±5,2	51 34	58,6±5,3 39,1±5,2
Всего положительных: Total number of the positive:	70	81,4±4,2	65	74,7±4,7
Искомые возбудители не обнаружены: Pathogens of interest were not detected:	16	18,6±4,2	22	25,3±4,7
Всего проб: Total amount of samples:	86	100	87	100

*Неферментирующие грамотрицательные бактерии;

**Коагулазонегативные стафилококки.

*Gram-negative non-fermenting bacteria;

**Coagulase-negative staphylococcus.

Характеристика лекарственной устойчивости. Следует отметить, что среди грамположительных микроорганизмов как в первой, так и во второй группе проб выявлена равная доля лекарственно устойчивых стафилококков (8,2 и 8,1 % соответственно), проявляющих резистентность практически ко всем группам АМП (β-лактамам, фторхинолонам, макролидам, аминогликозидам, тетрациклинам). В том числе в пробах первой группы получен один изолят *S. aureus* MRSA, устойчивый к линезолиду, и один изолят КНС *S. haemolyticus*, устойчивый к ме-

ропенему, т.е. к препаратам резерва. В пробах второй группы получен один изолят КНС *S. capitis*, устойчивый к линезолиду. С учетом массивности выделения стафилококков в пробах мокроты (до 10⁷ КОЕ/мл) регистрация этих штаммов в госпитальных учреждениях в качестве этиологических агентов пневмоний значительно ограничивает возможности лечения.

Основной грамотрицательный патоген – *K. pneumoniae* – выявлен в обеих группах проб, но лекарственно устойчивые штаммы – продуценты БЛРС – выявлены только в первой группе, определяя 3,6 %

Таблица 3 / Table 3

Видовой состав грибов рода *Candida*, выделенных из мокроты двух групп больных пневмонией
Candida fungi species composition, isolated from two groups of patients with community-acquired pneumonia

Видовой состав грибов рода <i>Candida</i> <i>Candida</i> fungi species composition	Концентрация Concentration	1-я группа Covid-19+, N=56 1 st group Covid-19+, N=56		2-я группа Covid-19-, N=51 2 nd group Covid-19-, N=51	
		абс. число abs.	%	абс. число abs.	%
<i>C. albicans</i>	10 ² –10 ⁵	41	73,2±5,9	39	76,5±5,9
<i>C. glabrata</i>	10 ⁴ –10 ⁷	9	16,1±4,9	7	9,8±4,2
<i>C. krusei</i>	10 ² –10 ⁵	6	10,7±4,1	5	13,7±4,8
Итого: Total:		56	100	51	100

Таблица 4 / Table 4

Уровень выявления бактериальных ассоциаций в составе бактериальной микрофлоры мокрот двух групп больных пневмонией
Rate of bacterial associations identification in bacterial microflora from the sputum of two patient groups with community-acquired pneumonia

Бактериальные ассоциации Bacterial associations	1-я группа Covid-19+ (N=70) 1 st group Covid-19+ (N=70)		2-я группа Covid-19- (N=65) 2 nd group Covid-19- (N=65)	
	абс. число abs.	%	абс. число abs.	%
Всего: Total:	25	35,7±5,7	17	26,2±5,5
В том числе: Including:				
2-компонентные Dual associations	20	28,6±5,4	15	23,1±5,2
3-компонентные Triple associations	4	5,7±2,8	2	3,1±2,1
5-компонентные Quinary associations	1	1,4±1,4	-	-

случаев заболеваний. При этом выявлена устойчивость к цефалоспорином 1–4 поколений, фторхинолонам, фосфомицину.

Среди НГОБ полирезистентные штаммы выделены от 4 (4,7 %) больных только в первой группе наблюдения (Covid-19+). Так, все 4 штамма *A. baumannii* с максимальным набором детерминант антибиотикорезистентности оказались чувствительными только к колистину. Формирование антибиотикорезистентной флоры связано с интенсивным антибактериальным лечением этой группы больных, использованием ИВЛ, других инвазивных методов лечения.

В мокроте 1-й группы больных отмечены случаи выделения грибов *C. glabrata*, также устойчивых ко всем антимикотикам.

Обнаружение антибиотико-устойчивых возбудителей является прогностически неблагоприятным признаком в плане возможного формирования ИСМП. В связи с этим обязательным условием при микробиологическом мониторинге является выявление маркеров антибиотикоустойчивости – фенотипов MRSA и MRSE для стафилококков. В отношении грамотрицательных микроорганизмов необходимо учитывать резистентность к цефалоспорином 1–4 поколений для ориентировочного определения продукции β-лактамаз различных классов, к карбапенемам – для выявления продукции карбапенемаз. При тестировании энтерококков применяют диски с ванкомицином для идентификации фенотипа VRE (vancomycin-resistant enterococci) [17, 18].

В данном наблюдении приведена количественная характеристика искомых патогенов. Нам представлялось важным регистрировать не только «диагностические титры» возбудителей (10^6 и выше). Учитывая сложность получения качественных проб мокроты для исследования, собранных с соблюдением сроков отбора образцов (с первых дней болезни, до начала лечения), правил транспортировки, сроков начала исследования в условиях массового поступления проб в лабораторию, мы сочли целесообразным представ-

вить истинную количественную характеристику микрофлоры. Клиническая оценка результатов анализа может быть дифференцированной в зависимости от сроков начала заболевания, фазы течения болезни, проводимого лечения, цели исследования и т.д.

Таким образом, при сравнительном анализе микрофлоры клинических образцов мокроты двух групп больных показано, что обе характеризуются высоким уровнем выделения бактериальной флоры (81,4 и 74,7 %), в том числе обычных возбудителей внебольничных пневмоний, высоким уровнем выделения грибов рода *Candida* (65,1 и 58,6 %) и микробных ассоциаций.

Группа больных коронавирусной пневмонией характеризуется более широким спектром определяемых возбудителей (16 видов против 12 в группе Covid-19–), выявлением полирезистентных к АМП грамотрицательных бактерий, более выраженным, в сравнении с группой Covid-19–, проявлением микробных ассоциаций (35,7 % против 26,2 %), более высоким уровнем выявления неферментирующей флоры (НГОБ) (11,6–6,9 %), обладающей природной множественной лекарственной устойчивостью и несущей дополнительные детерминанты резистентности, что ограничивает выбор эффективных АМП для лечения больных.

В обеих группах наблюдения отмечен высокий уровень выделения грибов рода *Candida*. Последние не являются классическими возбудителями пневмоний, но эта флора в составе микробных ассоциаций и как моноинфекция удлиняет и усложняет течение болезни (с учетом появления устойчивости к противогрибковым препаратам и склонностью к формированию биопленок), ухудшая прогноз заболевания.

Участие микробных ассоциаций в инфекционном процессе пневмоний создает дополнительные сложности в лечебной тактике, так как воздействие на один компонент ассоциации может привести к количественному увеличению другого компонента [19].

Неблагоприятным признаком для обеих групп пациентов является регистрация антибиотикорези-

стентности к «индикаторным» для *S. pneumoniae* АМП – пенициллину и клиндамицину у пневмококков, выделенных от 4 больных из 5. Также следует обратить внимание на регистрацию полирезистентной грамположительной флоры из числа КНС (*S. pseudointermedius*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*), выделяемых из образцов мокроты обеих групп наблюдения в высоком титре.

Пристального внимания требует факт регистрации энтеробактерий *Raoultella ornithinolytica* в образцах мокроты больных пневмонией 2-й группы наблюдения (Covid-19–). По данным последних публикаций, *Raoultella ornithinolytica*, циркулирующая в госпитальных условиях, быстро приобретает мультирезистентность, сохраняя чувствительность только к колистину и тигециклину, длительно сохраняется в пыли вентиляционных решеток благодаря низким метаболическим потребностям и представляет реальный риск инфицирования пациентов даже при отсутствии явных источников инфекции [20]. По мнению A. Sekowska, *Raoultella spp.* рассматривается как кандидат на роль ведущего госпитального патогена в ближайшем будущем [21]. Точная идентификация всех патогенов очень важна, т.к. она позволяет определить адекватные приемы лечения и тактику эпидемиологического надзора.

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

Список литературы

1. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Тюрин И.Е., Рачина С.А. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике: пособие для врачей. М.; 2010. 106 с.
2. Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф., Чазова Т.А., Тюрин Ю.А., Исаева Г.Ш., Зарипова А.З., Пяташина М.А., Авдонина Л.Г., Юзубаева Л.Р. Внебольничные пневмонии пневмококковой этиологии и микробиологические аспекты назофарингеального носительства *Streptococcus pneumoniae* в Республике Татарстан. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(3):271–8.
3. Brun-Busson Ch. Des germes si ordinaires. *Le chercheur*. 1994; 25:706–9.
4. Головерова Ю.А., Мар'ин Г.Г., Шабалина С.В., Тутельян А.В., Орлова О.А., Акимкин В.Г. Уровень заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, в отделениях высокого эпидемиологического риска инфицирования. *Инфекционные болезни*. 2019; 17(3):69–73.
5. Орлова О.А., Акимкин В.Г. Организация эпидемиологической диагностики вентилятор-ассоциированных инфекций дыхательных путей. *Медицинский алфавит*. 2017; 3(30):15–9.
6. Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишенина О.В., Ряпис Л.А., Стасенко В.Л., Фельдблюм И.В., Шкарин В.В. Госпитальный штамм – непознанная реальность. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013; 1(68):30–5.
7. Брусина Е.Б. Эпидемиология инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, вызванных возбудителями группы сапронозов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; 14(2):50–6.
8. Kreitmenn L., Monard C., Dauwalder O., Simon M., Argaud L. Early bacterial co-infection in ARDS related to COVID-19. *Intensive Care Med*. 2020; 46(9):1787–9. DOI: 10.1007/s00134-020-06165-5.
9. Cucchiari D., Pericàs J.M., Riera J., Gumucio R., Coloma E., Nicolás D. Pneumococcal superinfection in COVID-19 patients: A series of 5 cases. *Med. Clin. (Barc)*. 2020 Jun 5; S0025-7753(20)30349-3. DOI: 10.1016/j.medcli.2020.05.022.
10. Chaudhary W.A., Chong P.L., Mani B.I., Asli R., Momin R.N., Abdullah M.S., Chong V.H. Primary respiratory bacterial coinfections in patients with COVID-19. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2020; 103(2):917–9. DOI: 10.4269/ajtmh.20-0498.
11. Hughes S., Troise O., Donaldson H., Mughal N., Moore L.S. Bacterial and fungal coinfection among hospitalised patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary care setting. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020; 26(10):1395–9. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.06.025.
12. Слепакова С.А. Возбудители кандид-инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии. *Инфекция и иммунитет*. 2012; 2(1–2):495.
13. Петрухина М.И., Мартынова А.М., Политова Н.Г., Старостина Н.В., Каира А.Н. Результаты микробиологического мониторинга циркуляции грибов рода *Candida* в детском и взрослом многопрофильных стационарах. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 1(98):33–9.
14. Lansbury L., Lim B., Baskaran V., Lim W.S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* 2020; 81(2):266–75. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.05.
15. Teng F., Liu X., Guo S.-b., Li Z., Ji W.-Q., Zhang F., Zhu X. Community-acquired bacterial co-infection predicts severity and mortality in influenza-associated pneumonia admitted patients. *J. Infect. Chemother*. 2019; 25(2):129–36. DOI: 10.1016/j.jiac.2018.10.014.
16. Борисова О.Ю., Алешкин В.А., Пименова А.С., Крюков А.И., Кунельская Н.Л., Гуров А.В., Шадрин Г.Б., Товмасын А.С., Ефимов Б.А., Кафарская Л.И. Микробный состав микрофлоры ротоглотки у больных с тонзиллярной патологией. *Инфекция и иммунитет*. 2015; 5(3):225–32.
17. Демиховская Е.В. Беседы с микробиологом. *Болезни и антибиотики*. 2011; 2(05):13–9.
18. Демиховская Е.В. Ванкомицин-резистентные энтерококки как возбудители внутрибольничных инфекций. *Болезни и антибиотики*. 2013; 1(8):68–71.
19. Симонова Е.В. Значение микробных ассоциантов в развитии госпитальных инфекций. *Инфекция и иммунитет*. 2012; 2(1–2):495.
20. Чезганова Е.А., Ефимова О.С., Созинов С.А., Ефимова А.Р., Сахарова В.М., Кутихин А.Г., Основа М.В., Исмаилов З.Р., Брусина Е.Б. Больничная пыль как потенциальный резервуар госпитальных штаммов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019; 19(4):82–92.
21. Sêkowska A., Bogiel T., Woźniak M., Gospodarek-Komkowska E. *Raoultella spp.* – reliable identification, susceptibility to antimicrobials and antibiotic resistance mechanisms. *J. Med. Microbiol.* 2020; 69(2):233–8. DOI: 10.1099/jmm.0.001150.

References

1. Chuchalin A.G., Sinopal'nikov A.I., Kozlov R.S., Tyurin I.E., Rachina S.A. [Community-acquired pneumonia in adults: practical recommendations on diagnostics, treatment and prevention (a manual for doctors)]. M.; 2010. 106 p.
2. Bayazitova L.T., Tyupkina O.F., Chazova T.A., Tyurin Yu.A., Isaeva G.S., Zaripova A.Z., Patyashina M.A., Avdonina L.G., Yuzlibaeva L.R. [Community-acquired pneumonia of pneumococcal etiology and microbiological aspects of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in children in the Republic of Tatarstan]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2017; 7(3):271–8. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-3-271-278.
3. Brun-Busson Ch. Des germes si ordinaires. *Le chercheur*. 1994; 25:706–9.
4. Goloverova Yu. A., Mar'in G.G., Shabalina S.V., Tutelyan A.V., Orlova O.A., Akimkin V.G. [Incidence of health care-associated infections in high-risk hospital units]. *Infektsionnye Bolezni [Infectious Diseases]*. 2019; 17(3):69–73. DOI: 10.20953/1729-9225-2019-3-69-73.
5. Orlova O.A., Akimkin V.G. [Organization of epidemiological diagnosis of ventilator-associated respiratory infections]. *Meditsinskiy alfavit*. Medical Alphabet 2017; 3(30): 15–19. (in Russian)
6. Briko N.I., Brusina E.B., Zueva L.P., Kovalishena O.V., Ryapis L.A., Stasenko V.L., Kovalishena O.V., Ryapis L.A., Stasenko V.L., Fel'dblum I.V., Shkarin V.V. [Hospital strain – mysterious reality]. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2013; 1(68):30–5.
7. Brusina E.B. [Epidemiology of healthcare-associated infections caused by sapronoses group pathogens]. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2015; 14(2):50–6.
8. Kreitmenn L., Monard C., Dauwalder O., Simon M., Argaud L. Early bacterial co-infection in ARDS related to COVID-19. *Intensive Care Med*. 2020; 46(9):1787–9. DOI: 10.1007/s00134-020-06165-5.
9. Cucchiari D., Pericàs J.M., Riera J., Gumucio R., Coloma E., Nicolás D. Pneumococcal superinfection in COVID-19 patients: A series of 5 cases. *Med. Clin. (Barc)*. 2020 Jun 5; S0025-7753(20)30349-3. DOI: 10.1016/j.medcli.2020.05.022.
10. Chaudhary W.A., Chong P.L., Mani B.I., Asli R., Momin R.N., Abdullah M.S., Chong V.H. Primary respiratory bacterial coinfections in patients with COVID-19. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2020; 103(2):917–9. DOI: 10.4269/ajtmh.20-0498.
11. Hughes S., Troise O., Donaldson H., Mughal N., Moore

11. Hughes S., Troise O., Donaldson H., Mughal N., Moore L.S. Bacterial and fungal coinfection among hospitalised patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary care setting. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020; 26(10):1395–9. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.06.025.
12. Slepakova S.A. [The causative agents of candida infections in the intensive care units]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2012; 2 (1-2): 495. (in Russian)
13. Petrukhina M.I., Martynova A.M., Politova N.G., Starostina N.V., Kaira A.N. [Circulation of fungi of the genus candida in children's and adult multipurpose hospitals]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2018; 1(98):33–9.
14. Lansbury L., Lim B., Baskaran V., Lim W.S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* 2020; 81(2):266–75. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.05.
15. Teng F., Liu X., Guo S.-b., Li Z., Ji W.-Q., Zhang F., Zhu X. Community-acquired bacterial co-infection predicts severity and mortality in influenza-associated pneumonia admitted patients. *J. Infect. Chemother.* 2019; 25(2):129–36. DOI: 10.1016/j.jiac.2018.10.014.
16. Borisova O. Yu., Aleshkin V.A., Pimenova A.S., Kryukov A.I., Kunel'skaya N.L., Gurov A.V., Shadrin G.B., Tovmasyan A.S., Efimov B.A., Kafarskaya L.I. [Microbial landscape of microflora of a pharynx in patients with tonsillitic pathology]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2015; 5(3):225–32.
17. Demikhovskaya E.V. [Conversations with a microbiologist]. *Bolezni i Antibiotiki [Diseases and Antibiotics]*. 2011; 2(05):13–9.
18. Demikhovskaya E.V. [Vancomycin-resistant enterococci as causative agents of nosocomial infections]. *Bolezni i Antibiotiki [Diseases and Antibiotics]*. 2013; 1(8):68–71.
19. Simonova E.V. [The importance of microbial associates in the development of nosocomial infections]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2012; 2(1–2):495.
20. Chezganova E.A., Efimova O.S., Sozinov S.A., Efimova A.R., Sakharova V.M., Kutikhin A.G., Osnova M.V., Ismagilov Z.R., Brusina E.B. [Particulate matter in a hospital environment: as potential reservoir for hospital strains]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2019; 18(4):82–92. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-82-92.
21. Sękowska A., Bogiel T., Woźniak M., Gospodarek-Komkowska E. *Raoultella spp.* – reliable identification, susceptibility to antimicrobials and antibiotic resistance mechanisms. *J. Med. Microbiol.* 2020; 69(2):233–8. DOI: 10.1099/jmm.0.001150.

Authors:

Bondarenko A.P., Shmylenko V.A., Trotsenko O.E., Kotova V.O., Butakova L.V., Bazykina E.A. Khabarovsk Research Institute of Microbiology and Epidemiology. 2, Shevchenko St., Khabarovsk, 680610, Russian Federation. E-mail: adm@hniiem.ru.

Об авторах:

Бондаренко А.П., Шмыленко В.А., Троценко О.Е., Котова В.О., Бутакова Л.В., Базыкина Е.А. Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии. Российская Федерация, 680610, Хабаровск, ул. Шевченко, 2. E-mail: adm@hniiem.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-50-55

УДК 616.98:579.841.95

О.А. Волох, С.В. Борисова, Д.Н. Бибииков, Е.М. Кузнецова, Ю.И. Самохвалова, Н.Г. Авдеева,
А.В. Комиссаров, А.К. Никифоров

ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ВАКЦИННОГО ШТАММА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

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

Цель. Изучить возможность применения электрооптического анализа для оценки жизнеспособности клеток вакцинного штамма туляремиального микроба на этапах получения экспериментальной живой туляремиальной вакцины. **Материалы и методы.** Объектом исследования стала культура клеток *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Исследования проводились на всех этапах получения экспериментальной живой туляремиальной вакцины по усовершенствованной технологии: выращивание, концентрирование, диафильтрация, сведение со средами высушивания, стабилизация, хранение (срок наблюдения два года). Электрооптический анализ по показателю «анизотропия поляризуемости» бактериальной клетки производился с помощью устройства EloTrace (EloSystems, Германия). Общую концентрацию клеток измеряли денситометрически при 590 нм и спектрометрически при 650 нм, оценку жизнеспособности проводили высевом на пластинки с FT-агаром. **Результаты и обсуждение.** В ходе эксперимента показано, что изменение анизотропии поляризуемости клетки при частотах 900 кГц и 2100 кГц, отражающее состояние цитоплазмы и цитоплазматической мембраны соответственно является самым ранним ответом на изменения жизненных показателей бактериальной культуры в процессе выращивания. В свою очередь, снижение жизнеспособности клеток *F. tularensis* происходило гораздо раньше, чем снижение концентрации клеток. Показано сохранение жизнеспособности клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ на всех этапах получения экспериментальной живой туляремиальной вакцины. Электрооптический анализ позволяет регистрировать изменения жизненных показателей клеток микроорганизма в режиме реального времени, тогда как оценка жизнеспособности бактериологическим методом занимает 5 сут. Различные этапы производства туляремиальной вакцины влияют на жизненные показатели клеток *F. tularensis*, а электрооптический анализ является перспективным методом контроля показателя «Специфическая активность (количество живых микробных клеток)».

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, электрооптический анализ, живая туляремиальная вакцина, специфическая активность.

Корреспондирующий автор: Волох Оксана Александровна, e-mail: lhv@microbe.ru.

Для цитирования: Волох О.А., Борисова С.В., Бибииков Д.Н., Кузнецова Е.М., Самохвалова Ю.И., Авдеева Н.Г., Комиссаров А.В., Никифоров А.К. Электрооптический анализ жизнеспособности клеток вакцинного штамма туляремиального микроба. Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 3:50–55. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-50-55

Поступила 18.03.20. Отправлена на доработку 13.05.20. Принята к публ. 08.09.20.

O.A. Volokh, S.V. Borisova, D.N. Bibikov, E.M. Kuznetsova, Yu.I. Samokhvalova, N.G. Avdeeva,
A.V. Komissarov, A.K. Nikiforov

Electro-Optical Analysis of Cell Viability of Tularemia Microbe Vaccine Strain

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

Abstract. Objective: to study the possibility of applying electro-optical analysis for the assessment of cell viability of tularemia microbe vaccine strain at different stages of experimental live tularemia vaccine production. **Materials and methods.** The research object was a cell culture of *Francisella tularensis* 15 NIEG. Investigations were carried out at all stages of experimental live tularemia vaccine (ELTV) manufacturing according to an advanced technology: cultivation, concentrating, diafiltration, mixing with drying media, stabilization, and storage (two-year period of observation). Electro-optical analysis by the parameter "polarizability anisotropy" of bacterial cell was conducted with the help of EloTrace (EloSystems, Germany). Total concentration of cells was evaluated using density metering at 590 nm and spectrometry – at 650 nm. Viability was assessed through inoculation of plates with FT-agar. **Results and discussion.** The experiment has demonstrated that the change in polarizability anisotropy of the cell at the frequencies of 900 kHz and 2100 kHz, reflecting the state of cytoplasm and cytoplasmic membrane, respectively, is the earliest response to changes in vital indicators of bacterial culture in the process of cultivation. Thereby, the decrease in viability of *F. tularensis* cells occurs well before the decrease in cell concentration. We have shown the preservation of viability of *F. tularensis* 15 NIEG cells at all stages of experimental live tularemia vaccine production. Electro-optical analysis allows for registering the changes in vital parameters of microorganism cells in real-time mode, while the assessment of viability applying bacteriological method takes up to 5 days. Different stages of tularemia vaccine manufacturing have impact on the vital indicators of *F. tularensis* cells, and electro-optical analysis is a prospect method of control of such parameter as "Specific activity (the number of live microbial cells)".

Key words: *Francisella tularensis*, electro-optical analysis, live tularemia vaccine, specific activity.

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

Corresponding author: Oksana A. Volokh, e-mail: lhv@microbe.ru.

Citation: Volokh O.A., Borisova S.V., Bibikov D.N., Kuznetsova E.M., Samokhvalova Yu.I., Avdeeva N.G., Komissarov A.V., Nikiforov A.K. Electro-Optical Analysis of Cell Viability of Tularemia Microbe Vaccine Strain. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:50–55. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-50-55

Received 18.03.20. Revised 13.05.20. Accepted 08.09.20.

Volokh O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>
Borisova S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3793-6526>
Kuznetsova E.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0441-9269>
Komissarov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1609-0384>

Вакцинация является самым надежным способом профилактики туляремии. В настоящее время в РФ для специфической профилактики применяют туляремийную живую сухую вакцину, которая в 2011 г. приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 31.01.2011 № 51н включена в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Ежегодно в России вакцинируют и ревакцинируют около 1 млн человек [1, 2].

Основным компонентом вакцины являются клетки вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [3]. Производство вакцины представляет собой сложный многоступенчатый процесс, включающий получение жизнеспособных иммуногенных бактерий вакцинного штамма и приготовление из них готовой лекарственной формы – лиофилизата. Для реализации оптимального выхода бактериальной биомассы необходим комплексный контроль ферментации и качества получаемой бактериальной культуры. Качество препарата на стадиях его производства контролируется в соответствии с нормативной документацией, используются стандартные микробиологические и биологические методы. Но длительное время получения результата анализа, а также невозможность контролировать состояние бактериальной клетки является существенным недостатком данных методов. Постоянно совершенствуются и создаются новые методы производства и контроля препаратов [4, 5]. Внедрение новых инструментальных методов контроля, позволяющих оценивать основные параметры и физиологическое состояние бактериальной клетки, является перспективным направлением исследований.

Одним из новейших методов оценивания параметров развития культуры является электрооптический (ЭО) мониторинг. Его применение обладает рядом преимуществ. Использование электрооптического мониторинга позволяет производить измерения в режиме реального времени без специальной пробоподготовки. Воздействие электрического поля на клетки во время процедуры минимально и не приводит к их гибели, а влияние поддерживающей среды на точность измерения незначительно.

Метод электрооптического анализа основан на регистрации изменения анизотропии поляризуемости (АП) – оптических свойств микробной суспензии под влиянием переменного электрического поля. Воздействие электрического поля на культуру вызывает появление на клетках индуцированного диполя, связанного с перераспределением объемных и поверхностных зарядов. Их распределение и величина

определяются действующим механизмом поляризуемости, который характеризуется появлением зарядов на границе раздела сред [6, 7]. Для живой клетки такой границей является поверхность соприкосновения цитоплазматической мембраны с внешней средой. К преимуществам электрооптического метода исследования можно отнести высокую чувствительность электрооптических характеристик к изменениям свойств клеток, обусловленных их метаболизмом, адсорбцией, взаимодействием с биологически активными веществами и химическими агентами, а также возможность проводить исследования, не повреждая и не разрушая клетки [8].

ЭО-анализ можно использовать для исследования изменений электрофизических и морфометрических параметров клетки. Ранее нами была исследована возможность использования результатов электрооптических измерений для оперативного определения изменения жизнеспособности клеток до и после внешних экстремальных воздействий, таких как воздействие антибиотиков и дезинфицирующих средств [9].

Целью настоящего исследования является изучение возможности применения электрооптического анализа для оценки жизнеспособности клеток вакцинного штамма туляремийного микроба на этапах культивирования, подготовки биомассы, получения и хранения лиофилизата, а также исследование изменений, происходящих с клетками *F. tularensis* в процессе культивирования.

Материалы и методы

В работе использовали вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученный из «Государственной коллекции патогенных бактерий». Выращивание проводилось на пластинках с ФТ-агаром на основе сухого рыбно-солевого агара с добавлением сухой глюкозо-витаминной добавки и селективной добавки pH 7,2 (ФБУН «ГНЦ ПМБ», п. Оболенск) и в жидкой питательной среде на основе гидролизата фибрина pH 7,2 [10]. Посевным материалом служила двухсуточная агаровая культура в концентрации 4 млрд клеток в мл. Выращивание производилось методом глубинного культивирования в течение (24 ± 1) ч при температуре 37 °C и pH 7,2 при непрерывном перемешивании и аэрации, в качестве подпитки использовался раствор 40 % глюкозы. Этапы концентрирования и отмывки от питательной среды 0,86 % раствором NaCl проводили методом тангенциальной микрофльтрации по ранее описанной методике [5]. В качестве сред высушивания применяли сре-

ду желатино-глутаминовую (СЖГТ) и экспериментальную среду с хитозаном (ЭСВХ). Лиофилизацию проводили на лиофилизационной установке Martin Christ Epsilon 2-6D (Германия) [11]. Полученные серии экспериментальной живой туляремийной вакцины (ЭЖТВ) контролировали по показателям «жизнеспособность» и «степень диссоциации» [12]. Общую концентрацию клеток измеряли денситометрически при 590 нм, оценку жизнеспособности проводили высевом на пластинки с FT-агаром. Посевы выдерживали при 37 °С в течение 5 сут. Коэффициент жизнеспособности рассчитывали в % живых микробных клеток (ж.м.к.) с учетом концентрации и степени разведения высеваемой культуры. Степень диссоциации культуры контролировали на 5-е сутки после посева и через 24 ч после инкубации при ± 4 °С.

Электрооптический мониторинг физиологического состояния бактериальных клеток проводили на полностью автоматизированной аналитической установке EloTrace (EloSystems, Германия). Измерения проводили на всех стадиях получения экспериментальной живой туляремийной вакцины. Пробоподготовка осуществлялась автоматически по стандартному протоколу аналитической установки: клетки автоматически отделялись от культурального бульона фильтрованием через целлюлозный фильтр с размером пор 0,45 мкм, концентрат клеток разбавлялся водой MilliQ с проводимостью 5 МКС·см⁻¹ до конечной оптической плотности OD600 = (0,1 $\pm$ 5) % перед электрооптическим измерением. В основе электрооптического метода лежит поляризация частиц, суспендированных в низкопроводящей жидкости под воздействием переменного электромагнитного поля. Регистрируемым параметром является изменение оптических свойств суспензии бактериальных клеток под воздействием переменного электромагнитного поля в широком диапазоне частот. Основным измеряемым параметром являлась анизотропия поляризуемости (АП), измеряемая в условных единицах. EloTrace позволяет регистрировать АП в диапазоне частот электрического поля от 10 кГц до 40 МГц. Для измерения АП клеток использованы частоты 900 и 2100 кГц. Данные частоты отражают состояние цитоплазмы и цитоплазматической мембраны соответственно [7, 13].

Для измерения тесноты связи между жизнеспособностью и АП использовался линейный коэффициент корреляции Пирсона. Корреляционная связь между показателями считается сильной, если коэффициент Пирсона $\geq 0,7$ [14].

Результаты и обсуждение

Процесс изготовления экспериментальной живой туляремийной вакцины состоял из нескольких стадий: культивирование; концентрирование; сведение со средами высушивания; лиофилизация; хранение при ± 4 °С [5].

В ходе проведенного нами эксперимента изуче-

но изменение размера клеток, показатели анизотропии поляризуемости и «жизнеспособность» клеток *F. tularensis* в культуре в зависимости от технологической стадии подготовки клеточной массы и лиофилизации.

Электрооптический мониторинг показал, что размер клеток составляет в среднем (1,2 $\pm$ 0,1) мкм, что согласуется с данными, полученными ранее. Отмечена высокая степень корреляции между показателями АП клетки при частотах 900 и 2100 кГц, отражающих состояние цитоплазмы и цитоплазматической мембраны соответственно. Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,98. Использование агаровой или бульонной культуры, замена питательной среды в клеточной суспензии на 0,86 % раствор NaCl, добавление сред высушивания (в т.ч. экспериментальных) не оказывали значительного влияния на данный показатель.

При сравнении жизнеспособности клеток *F. tularensis* на этапе сведения со средами высушивания отмечено, что после сведения с СЖГТ и ЭСВХ неотмытых клеток АП культуры повышается в среднем на 5–10 %. Стандартными методами микробиологического анализа подтверждено отсутствие повреждающего действия новых технологических приемов и экспериментальной среды высушивания на качество ЭЖТВ по показателям «жизнеспособность» и «степень диссоциации». Показатель «степень диссоциации» на этапах обработки биомассы (концентрирование, отмывка и сведение со средами высушивания) составлял в среднем (97 $\pm$ 2) % колоний в SR-форме.

На рис. 1 можно заметить, что показатель АП цитоплазмы более лабилен, чем АП цитоплазматической мембраны, хотя динамика изменений обоих показателей соответствует кривой роста культуры. Спустя 6 ч АП достигает своего пика, а спустя 8 ч жизнеспособность культуры снижается, после чего снова происходит скачок (18 ч), а затем окончательное угнетение жизнеспособности. На рис. 2, где отображена оптическая плотность среды, так же заметны изменения, но с опозданием в 2 ч. Так, плотность среды достигает своего максимума лишь к 8 ч культивирования, после чего происходит уменьшение

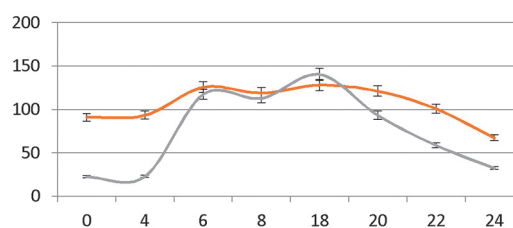


Рис. 1. Изменение анизотропии поляризуемости клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ в процессе глубокого культивирования на частоте 2100 кГц (красная линия) и 900 кГц (зеленая линия) с течением времени:

Ось ординат — показатель АП, ось абсцисс — время, ч

Fig. 1. Changes in polarizability anisotropy (PA) in *F. tularensis* 15 NIEG cells during submerged cultivation at 2100 kHz (red line) and 900 kHz (green line) with time:

Y-axis — PA indicator, X-axis — time, h

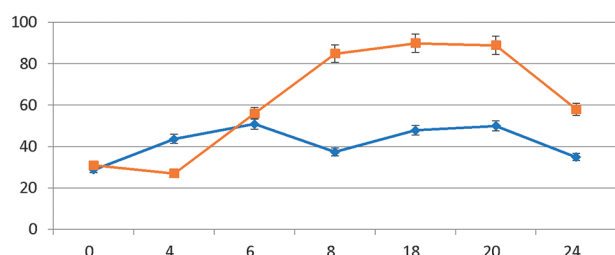


Рис. 2. Динамика показателей «концентрация» и «жизнеспособность» клеток вакцинного штамма в процессе глубинного культивирования:

Синяя линия – оптическая плотность при 650 нм ($\times 10^{-3}$), красная – жизнеспособность (K, %). Ось абсцисс – время, ч

Fig. 2. Dynamics of indicators “concentration” and “viability” of cells of the vaccine strain in the process of submerged cultivation:

Blue line – optical density at 650 nm ($\times 10^{-3}$), red line – viability (K, %). X-axis – time, h

плотности, а затем снова рост. Через 22 ч снова наступает снижение оптической плотности, достигая своего минимума к 24 ч. Таким образом, можно говорить о том, что ЭО-мониторинг «предсказывает» снижение клеточной массы, связанное, скорее всего, с недостатком питательных веществ.

В то же время можно отметить, что культуры туляремиального микроба с высокой жизнеспособностью ($\geq 80\%$) обладали большим показателем АП, при снижении жизнеспособности клеток значение их показателя АП уменьшалось, что согласуется с литературными данными [6, 7, 15].

На следующем этапе исследовали влияние условий концентрирования и лиофилизации на физиологическое состояние клеток туляремиального микроба.

В таблице отображены анализируемые показатели культуры *F. tularensis* на основных этапах получения ЭЖТВ. Как известно, сведение со средой высушивания нужно для предотвращения разрушения клеток при замораживании, лиофилизации и длительном хранении за счет стабилизации конформационного состояния белковых молекул [16]. В то же время показатели АП в концентрированной и сведенной со средой высушивания биомассе уменьшались, несмотря на высокую жизнеспособность клеток. Это может быть связано со снижением поляризуемости бактериальной клетки при увеличении ионной силы раствора (соли в концентратах и в средах высушивания), что согласуется с литературными данными [17].

Влияние длительного хранения на лиофилизаты лабораторных серий ЭЖТВ изучали через 12 и 24 мес. хранения при $+4^\circ\text{C}$. Взято несколько лабораторных серий ЭЖТВ: 021 и 023 сделаны с использованием жидкой среды высушивания СЖГТ, а 022 и 024 – с использованием ЭСВХ. Сухую вакцину суспендировали в 5 мл 0,86 % раствора NaCl, после чего проводили измерение жизнеспособности культуры на электрооптическом анализаторе EloTrace при частоте 900 кГц.

На рис. 3 показано, что после 24 месяцев хранения показатель АП клеток *F. tularensis* снизился примерно на 30–35 %. Между сериями туляремиальной вакцины наблюдаются незначительные колебания, которые не зависят от среды высушивания и от степени отмывки бактериальной массы.

На рис. 4 показана жизнеспособность культуры, которая измерялась бактериологическим ме-

Показатели физиологического состояния клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ на этапах культивирования, концентрирования и сведения со средами высушивания

Indicators of physiological state of *F. tularensis* 15 NIEG cells at the stages of cultivation, concentrating, and mixing with drying media

Проба Sample	Концентрация млрд м.к./мл Concentration, Bln mc/ml	Жизнеспособность K, % Viability K, %	Показатель АП PA indicator		Средний размер клеток, мкм Medium size of the cells, mkm
			900 кГц 900 kHz	2100 кГц 2100 kHz	
Инокулят (агаровая культура) Inoculate (agar culture)	4,8 $\pm$ 0,5	30 $\pm$ 1	22,4	90,83	1,1 $\pm$ 0,01
Бульонная культура (лаг-фаза) Broth culture (Lag-phase)	6,2 $\pm$ 0,5	27 $\pm$ 1	23,07	93,39	1,3 $\pm$ 0,03
Бульонная культура (лог-фаза) Broth culture (Log-phase)	26 $\pm$ 1	85 $\pm$ 1	112,95	119,17	1,9 $\pm$ 0,04
Бульонная культура (поздняя лог-фаза) Broth culture (later log-phase)	29 $\pm$ 1	90 $\pm$ 1	140,4	127,98	1,1 $\pm$ 0,01
Бульонная культура (стационарная фаза) Broth culture (Stationary phase)	30 $\pm$ 1	89 $\pm$ 1	93,31	121,16	1,2 $\pm$ 0,01
Бульонная культура (фаза отмирания) Broth culture (die away phase)	20 $\pm$ 1	58 $\pm$ 1	32,41	67,25	1,3 $\pm$ 0,03
Биомасса сконцентрированная «неотмытая» Concentrated “unwashed” biomass	100 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1	48,19	28,84	1,1 $\pm$ 0,02
Биомасса сконцентрированная «отмытая» Concentrated “washed” biomass	100 $\pm$ 1	98 $\pm$ 1	50,34	32,46	1,2 $\pm$ 0,01
Биомасса + СЖГТ Biomass + gelatin-glutamine medium	25 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1	78,05	33,41	1,5 $\pm$ 0,1
Биомасса + ЭСВХ Biomass + experimental medium with chitosan	25 $\pm$ 1	89 $\pm$ 1	57,57	35,8	1,9 $\pm$ 0,07

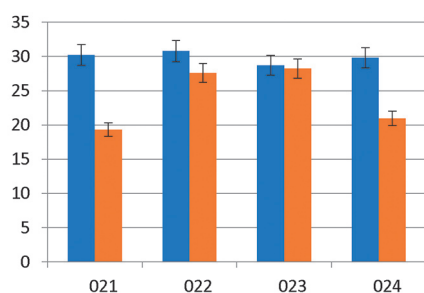


Рис. 3. Изменение анизотропии поляризуемости клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ после длительного хранения:

Столбцы: синие – 12 мес. хранения, красные – 24 мес. Ось абсцисс – образцы серий № 021, 022, 023, 024; ось ординат – показатель АП, измерение при 900 кГц

Fig. 3. Changes in polarizability anisotropy of *F. tularensis* 15 NIEG cells after long-term storage:

Blue columns – 12 months of preservation, red columns – 24 months. X-axis – the samples of batches No 021, 022, 023, 024; Y-axis PA indicator, measured at 900 kHz

тодом. Установлено, что коэффициент жизнеспособности для всех анализируемых серий ЭЖТВ через 12–24 мес. хранения был более 40 %, что соответствует нормируемым показателям для живой туляреминой вакцины (не менее 40 %, согласно ФС.3.3.1.0019.15).

В процессе длительного хранения в течение срока, регламентированного для живой туляреминой вакцины, ЭЖТВ в высушенном состоянии жизненные показатели клеток *F. tularensis* практически не изменились, что говорит о том, что среды высушивания хорошо сохраняют специфическую активность препарата.

В ходе эксперимента показано, что метод электрооптического анализа гораздо быстрее реагирует на изменения жизненных показателей культуры клеток в процессе выращивания. Снижение жизнеспособности клеток *F. tularensis* происходило намного раньше, чем снижение оптической плотности среды. Кроме того, время, затраченное на проведение микробиологического анализа, составляет 5–6 сут, электрооптического мониторинга – 30–60 мин.

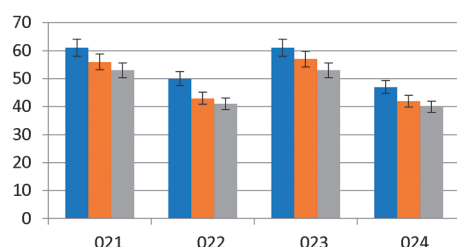


Рис. 4. Изменение показателя «жизнеспособность» экспериментальных серий ЭЖТВ в течение длительного хранения:

По оси ординат – К, %. Столбцы: синие – после сушки, красные – через 12 мес. хранения, зеленые – через 24 мес. хранения. Ось абсцисс – образцы серий № 021, 022, 023, 024

Fig. 4. Changes in viability indicator of experimental series of ELTV under long-term storage conditions:

Y-axis – K, %. Blue columns – after drying, red columns – after 12 months of storage, green ones – after 24 months of storage. X-axis – the samples of batches No 021, 022, 023, 024

Проведенные нами исследования показали перспективность применения метода электрооптического мониторинга для изучения особенностей физиологического состояния культуры клеток на разных стадиях роста бактериальной популяции в целом, для определения взаимодействия микроорганизмов с различными изменениями условий: отмывание, концентрирование, сведение со средами высушивания, длительное хранение. Разработка алгоритма проведения электрооптического мониторинга клеток штаммов-продуцентов вакцинных препаратов против опасных инфекционных заболеваний на модели туляреминого микроба является перспективной задачей дальнейшего исследования в данном направлении.

Таким образом, различные этапы получения туляреминой вакцины влияют на жизненные показатели клеток *F. tularensis*, а электрооптический анализ успешно регистрирует различные изменения жизненных показателей клеток микроорганизма в режиме реального времени. Разработка комплексного подхода к использованию новых инструментальных методов в сочетании со стандартными микробиологическими методами позволит упростить и ускорить этапы контроля состояния бактериальной культуры при внедрении новых технологических приемов культивирования, концентрирования и лиофилизации вакцинных штаммов.

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

Список литературы

1. Мещерякова И.С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика (к 80-летию создания первой туляреминой лаборатории в России). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 2(51):17–22.
2. Дятлов И.А., редактор. Туляремия: состояние проблемы и методы исследования. М.: Династия; 2019. 263 с.
3. Олсуфьев Н.Г., Дунаева Т.Н. Природная очаговость, эпидемиология и профилактика туляремии. М.; 1970. 272 с.
4. Касина И.В., Алексеева С.А., Бердникова З.Е., Немировская Т.И., Алехина А.С. Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины туляреминой живой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017; 17(4):240–47.
5. Волох О.А., Комиссаров А.В., Антонычева М.В., Лобовикова О.А., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Миронова Н.П., Бибииков Д.Н., Никифоров А.К. Совершенствование технологии получения живой туляреминой вакцины. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 3:81–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-81-84.
6. Bunin V.D., Ignatov O.V., Guliy O.I., Zaitseva I.S., O'Neil D., Ivinskii D. Electrooptical analysis of the Escherichia coli-phage interaction. *Anal. Biochem.* 2004; 328(2):181–6.
7. Junne S., Cruz-Bournazou M.N., Angersbach A., Gotz P. Electrooptical monitoring of cell polarizability and cell size in aerobic Escherichia coli batch cultivations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 37:935–42. DOI: 10.1007/s10295-010-0742-5.
8. Игнатов С.Г., Волошин А.Г., Бунин В.Д., Дятлов И.А. Электрооптический анализ в микробиологии. Серпухов: ФГУН ПИМБ; 2007. 159 с.
9. Борисова С.В., Кузнецова Е.М., Ерохин П.С., Волох О.А. Применение нового инструментального метода для оценки функционального состояния клеток *Francisella tularensis* в стрессовых условиях. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2019; 19(3):326–30.
10. Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Вахрушина И.И., Никифоров А.К. Питательная среда для глубокого культивирования туляреминого микроба. Патент РФ № 2518282, опубл. 10.06.2014 г. Бюл. № 16.
11. Бибииков Д.Н., Комиссаров А.В., Волох О.А., Кузнецова Е.М., Никифоров А.К. Способ получения лиофилизата вакцины

туляремийной живой. Патент РФ № 2716505, опубл. 12.03.2020 г. Бюл. № 8

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

13. Волошин А.Г., Бунин В.Д., Веревкин В.В., Игнатов С.Г. Электрооптический анализ как средство контроля за внешними воздействиями на клетки. *Бактериология*. 2017; 2(4):46–9.

14. Унгуряну Т.Н., Гржибовский А.М. Корреляционный анализ с использованием пакета статистических программ STATA. *Экология человека*. 2014; 9:60–4.

15. Angersbach A., Bunin V., Ignatov O. Electrooptical analysis of bacterial cells. In: Molecular and Colloidal Electro-Optics. Stoylov and Stoimenova (eds.) Chapter 13. London, New York: Taylor&Francis, Boca Raton; 2006. P. 307–26. DOI: 10.1201/9781420009859.ch13.

16. Rey L., May J.C., editor. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. London: Informa Healthcare; 2010. 564 p.

17. Zhivkov A.M., Gyurova A.Y. High frequency electric polarizability of bacteria *E. coli*: dependence on the medium ionic strength. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2008; 66(2):201–5. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.06.007.

References

1. Meshcheryakova I.S. [Tularemia: modern epidemiology and vaccinal prevention (on the 80th anniversary of establishing of the first tularemia laboratory in Russia)]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2010; 2(51):17–22.

2. Dyatlov I.A., editor. Tularemia: the state of the problem and methods of study. Moscow: “Dinastiya”; 2019. 263 p.

3. Olsuf'ev N.G., Dunaeva T.N. Natural Focality, Epidemiology, and Prophylaxis of Tularemia. M.; 1970. 272 p.

4. Kasina I.V., Alekseeva S.A., Berdnikova Z.E., Nemirovskaya T.I., Alekhina A.S. [Prospects for improving evaluation of live tularemia vaccine quality]. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]*. 2017; 17(4):240–47.

5. Volokh O.A., Komissarov A.V., Antonycheva M.V., Lobovikova O.A., Avdeeva N.G., Vakhrushina N.I., Mironova N.P., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. [Enhancement of the technology for live tularemia vaccine production]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (3):81–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-81-84.

6. Bunin V.D., Ignatov O.V., Guliy O.I., Zaitseva I.S., O'Neil D., Ivnitki D. Electrooptical analysis of the Escherichia coli-phage interaction. *Anal. Biochem*. 2004; 328(2):181–6.

7. Junne S., Cruz-Bournazou M.N., Angersbach A., Gotz P. Electrooptical monitoring of cell polarizability and cell size in aerobic Escherichia coli batch cultivations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2010; 37:935–42. DOI: 10.1007/s10295-010-0742-5.

8. Ignatov S.G., Voloshin A.G., Bunin V.D., Dyatlov I.A. [Electro-Optical Analysis in Microbiology]. Serpukhov; 2007. 159 p.

9. Borisova S.V., Kuznetsova E.M., Erokhin P.S., Volokh O.A. [Application of new instrumental method for the assessment of the functional state of *Francisella tularensis* cells under stressful conditions]. *Izvestiya Saratovskogo Universiteta. Novaya Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya [Bulletin of the Saratov University. New Series: Chemistry, Biology, and Ecology]*. 2019; 19(3):326–30.

10. Volokh O.A., Antonycheva M.V., Avdeeva N.G., Vakhrushina I.I., Nikiforov A.K. [Nutrient medium for submerged cultivation of tularemia microbe]. RF Patent No 2518282, Published on June 10, 2014. Bulletin No 16.

11. Bibikov D.N., Komissarov A.V., Volokh O.A., Kuznetsova E.M., Nikiforov A.K. [Method for the production of lyophilizate of live tularemia vaccine]. RF Patent No 2716505, published on March 12, 2020. Bulletin No 8.

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

13. Voloshin A.G., Bunin V.D., Verevkin V.V., Ignatov S.G. [Electro-optical analysis as a means of control over external effects on cells]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2017; 2(4):46–9.

14. Unguryanu T.N., Grizhebovsky A.M. [Correlation analysis using STATA]. *Ekologiya Cheloveka [Human Ecology]*. 2014; 9:60–4.

15. Angersbach A., Bunin V., Ignatov O. Electrooptical analysis of bacterial cells. In: Molecular and Colloidal Electro-Optics. Stoylov and Stoimenova (eds.) Chapter 13. London, New York: Taylor&Francis, Boca Raton; 2006. P. 307–26. DOI: 10.1201/9781420009859.ch13.

16. Rey L., May J.C., editor. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. London: Informa Healthcare; 2010. 564 p.

17. Zhivkov A.M., Gyurova A.Y. High frequency electric polarizability of bacteria *E. coli*: dependence on the medium ionic strength. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2008; 66(2):201–5. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.06.007.

Authors:

Volokh O.A., Borisova S.V., Bibikov D.N., Kuznetsova E.M., Samokhvalova Yu.I., Avdeeva N.G., Komissarov A.V., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Волох О.А., Борисова С.В., Бибииков Д.Н., Кузнецова Е.М., Самохвалова Ю.И., Авдеева Н.Г., Комиссаров А.В., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-56-61

УДК 616.98:842.23

Г.А. Ерошенко, Л.М. Куклева, Ж.В. Альхова, А.Н. Балыкова, Н.В. Попов, Я.М. Краснов,
Н.С. Червякова, В.В. Кутырев

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИСТОРИЯ КАРАКУМСКОГО ПУСТЫННОГО ОЧАГА

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

Цель исследования – анализ филогенетического родства штаммов и направлений распространения *Yersinia pestis* в Каракумском пустынном очаге в XX в. **Материалы и методы.** Выполнено полногеномное секвенирование 8 штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в Каракумском пустынном очаге в 1949–1985 гг. При проведении филогенетического анализа также использованы нуклеотидные последовательности 16 штаммов *Y. pestis* из сопредельных очагов Восточного и Северного Прикаспия 1917–2002 гг., секвенированные в РосНИПЧИ «Микроб» на платформе Genestudio Ion S5XL (Thermo Fischer Scientific). Филогенетический анализ выполнен на основе 1720 выявленных коровых SNPs. Построение филогенетического дерева проводили в программе PhyML 3.1 с помощью алгоритма Maximum Likelihood модели нуклеотидных замен GTR. **Результаты и обсуждение.** По данным полногеномного SNP анализа штаммов *Y. pestis* из Каракумского пустынного очага, очагов Восточного и Северного Прикаспия проведен филогенетический анализ популяций возбудителя чумы, циркулировавших в Туркменистане в XX в. Показано, что по территории Каракумского пустынного очага прошли три независимые волны распространения *Y. pestis*. Происхождение первой, зарегистрированной в 1912 г., вспышки чумы в юго-восточной части очага и ее этиологический агент остаются пока неустановленными. Вторая волна связана с распространением на этих территориях в 1949–1970 гг. северо-приаральской популяции 2.MED1 средневекового биовара, приведшим к проявлению здесь эпизоотической активности в 1949 г., а также к последующим случаям и вспышкам чумы в середине XX в. В середине второй половины прошлого века Каракумского пустынного очага достигла еще одна волна распространения 2.MED1 из Северного Прибалхашья. Эта центрально-азиатская популяция также укоренилась в природном биоценозе Каракумского очага. Полученные данные свидетельствуют об активных процессах распространения *Y. pestis* средневекового биовара в Восточном Прикаспии в южной подзоне пустынь Евразии в XX в.

Ключевые слова: Каракумский пустынный очаг, *Yersinia pestis*, филогенетическое родство, возбудитель чумы.

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

Для цитирования: Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Альхова Ж.В., Балыкова А.Н., Попов Н.В., Краснов Я.М., Червякова Н.С., Кутырев В.В. Филогенетическая история Каракумского пустынного очага. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:56–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-56-61
Поступила 22.06.20. Принята к публ. 25.06.20.

G.A. Eroshenko, L.M. Kukleva, Zh.V. Al'khova, A.N. Balykova, N.V. Popov, Ya.M. Krasnov,
N.S. Chervyakova, V.V. Kutyrev

Phylogenetic History of Kara Kum Desert Focus

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

Abstract. Objective of the study was to analyze phylogenetic relation of the strains and dissemination routes of *Yersinia pestis* in Kara Kum desert focus in XX century. **Materials and methods.** We have carried out whole genome sequencing of 8 *Yersinia pestis* strains isolated in Kara Kum desert focus between 1949 and 1985. We also used nucleotide sequences of 16 *Y. pestis* strains from neighboring foci of East and North Caspian Sea region dated 1917–2002, sequenced at the premises of RusRAPI "Microbe" on Genestudio Ion S5XL platform (Thermo Fischer Scientific). Phylogenetic analysis was performed based on 1720 identified core SNPs. Phylogenetic dendrogram was constructed using Maximum Likelihood algorithm, PhyML v. 3.1 software package, and nucleotide substitution model GTR. **Results and discussion.** On the basis of whole-genome SNP analysis of *Y. pestis* strains from Kara Kum desert focus, West and North Caspian Sea region foci analysis of plague agent populations circulating in Turkmenistan in XX century was conducted. It has been demonstrated that three separate waves of *Y. pestis* dissemination swept the territory of Kara Kum desert focus. The origin of the first one, registered in 1912, plague outbreak in south-eastern part of the focus and its etiological agent remain unspecified so far. The second wave is associated with distribution of North-Aral 2.MED1 population of medieval biovar in 1949–1970, which led to the emergence of epizootic activity in 1949, as well as subsequent cases and outbreaks of plague in this territory in the middle of the XX century. In the mid-second half of the past century, one more 2. MED1 dissemination wave from the North Balkhash region hit the Kara Kum desert focus. This central-asian population has also taken root in the natural biocenosis of the Kara Kum focus. The data obtained testify to active processes of distribution of *Y. pestis* of medieval biovar in East Caspian Sea region in southern sub-zone of Eurasian deserts in XX century.

Key words: Kara Kum desert focus, *Yersinia pestis*, phylogenetic relation, plague agent.

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

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

Citation: Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Al'khova Zh.V., Balykova A.N., Popov N.V., Krasnov Ya.M., Chervyakova N.S., Kutyrev V.V. Phylogenetic History of Kara Kum Desert Focus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:56–61. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-56-61

Received 22.06.20. Accepted 25.06.2020.

Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>
Kukleva L.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>
Al'khova Zh.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7681-5773>
Balykova A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3766-7979>
Popov N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4099-9261>
Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>
Chervyakova N.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3133-3820>
Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Каракумский пустынный очаг расположен к востоку от Каспийского моря в южной подзоне пустынь Центральной Азии. Он занимает большую часть Туркменистана. Общая площадь составляет 365560 км². Основная часть совпадает с границами крупнейшей в мире песчаной пустыни – Закаспийскими Каракумами. Основным носителем чумы в очаге является большая песчанка *Rhombomys opimus*. Основные переносчики – блоха *Xenopsylla hirtipes* и другие представители этого рода [1]. Первое появление чумы в Каракумском песчаном очаге отмечено в 1912 г. в юго-восточной части. В ауле Чайрук в окрестностях г. Мары произошла вспышка чумы, во время которой заболело и умерло 54 человека. Более ранние данные о проявлениях чумы в Каракумском пустынном очаге, как и во всем Туркменистане, отсутствуют. Происхождение вспышки 1912 г. неизвестно. Также отсутствуют штаммы *Y. pestis*, вызвавшие эту вспышку. В этот период и ранее, начиная с 1876 г., вспышки чумы происходили в Северо-Западном и Северном Прикаспии, а также в Закавказье [2]. Штаммы, выделенные в этих очагах, относятся к средневековому биовару основного подвида возбудителя чумы. Это высоковирулентные и эпидемически значимые штаммы. По генетической номенклатуре ветвей они относятся к линии 2.MED эволюции чумного микроба [3–9]. Ветвь 2.MED1 – самая молодая ветвь средневекового биовара. Она расположена на филогенетическом дереве средневекового биовара после 2.MED0, 2.MED2, 2.MED3 и недавно выявленной нами ветви 2.MED4. Популяция 2.MED1 занимает обширные пространства очаговых по чуме территорий Восточной Европы и Центральной Азии [10]. Доказано, что штаммы 2.MED1 являлись этиологическими агентами вспышек чумы в Северо-Западном и Северном Прикаспии в первой половине XX в. К середине того же века прикаспийская популяция 2.MED1 значительно расширила свой ареал в восточном направлении и укоренилась в Северном Приаралье, где она сохранилась во время длительного межэпизоотического периода, приведшего к ее исчезновению в самом Северном Прикаспии. При наступлении благоприятных климатических условий на фоне роста уровня Каспийского моря и повышения увлажненности климата штаммы 2.MED1 из Северного Приаралья повторно заселили очаги Северного, затем Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья [11, 12]. Ранее наряду с каспийской подветвью выявлена также центрально-азиатская подветвь 2.MED1, которая получила распространение в Центральной Азии в XX в. [10].

В Каракумском пустынном очаге эпизоотии на грызунах впервые зарегистрированы в 1949 г. Затем

они происходили здесь практически ежегодно до 1986 г. После перерыва с 1986 по 1989 год эпизоотии отмечались в 1991–1993 гг., а после перерыва с 1998 по 2003 год вновь зафиксированы в 2004 г. Во время наблюдения за Каракумским пустынным очагом в период с 1949 по 1985 год специалистами противочумной системы собрано большое количество штаммов *Y. pestis*, которые хранятся в Государственной коллекции патогенных бактерий на базе РосНИПЧИ «Микроб». Филогенетический анализ этих штаммов в сочетании с данными эпизоотологического и эпидемиологического мониторинга позволяет провести реконструкцию циркуляции *Y. pestis* в Каракумском пустынном очаге и на сопредельных территориях в XX в. Эти результаты необходимы для выявления закономерностей пространственно-временной циркуляции возбудителя чумы на территории Прикаспийской низменности и прогнозирования активизации природных очагов чумы, вызванной циклическими изменениями климата.

Цель работы – анализ филогенетического родства штаммов и направлений распространения *Y. pestis* в Каракумском пустынном очаге в XX в.

Материалы и методы

Штаммы. Исследованные в работе штаммы *Y. pestis* получены из Государственной коллекции патогенных бактерий на базе РосНИПЧИ «Микроб». Всего исследовано 24 штамма *Y. pestis*, преимущественно из Каракумского пустынного очага, сопредельных очагов Северного и Восточного Прикаспия. Анализ культурально-морфологических и биохимических свойств штаммов проводили в соответствии с принятыми методами лабораторной диагностики чумы [13].

Полногеномное секвенирование, идентификация SNPs, построение дендрограмм. Полногеномное секвенирование выполняли с помощью Genestudio Ion S5XL (Thermo Fischer Scientific). Для обработки данных и сборки последовательностей сырых ридов *de novo* использовали Ion Torrent Suite software package, 5.12 и Newbler gsAssembler 2.6. Секвенированные риды собирали в контиги со средним покрытием на геном 98,96 % (45-кратная глубина прочтения). Средний размер собранного генома составил 4,59 м.п.н. Коровые SNPs выявляли путем выравнивания контигов штаммов *Y. pestis* на геноме CO92 с помощью программы Snippy 4.6., затем удаляли 28 гомоплазий SNPs. Дендрограмму строили по алгоритму Maximum Likelihood с применением программы PhyML 3.1. Модель нуклеотидных замен GTR подобрана в программе Jmodeltest2 с учетом

АИС-критерия. Использовали 500 бутстреп-реплик. Визуализацию филогенетического дерева выполняли в программе Dendroscope V3.5.9.

Результаты и обсуждение

В этой работе нами изучены штаммы из Каракумского пустынного очага, выделенные в 1949–1985 гг. Для восьми из них проведено полногеномное секвенирование, включая 4 штамма от большой песчанки, 1 – от переносчиков (блох) и 3 – от человека. Для выяснения филогенетического родства этих штаммов в анализ включены также нуклеотидные последовательности штаммов из сопредельных пустынных очагов Центральной Азии – Копетдагского (1 штамм от большой песчанки, 1967 г.), Устюртского (2 штамма от большой песчанки, 1926, 1975 гг.), Северо-Приаральского (1 штамм от человека, 1945 г.), Мангышлакского (2 штамма от большой песчанки, 1967, 1975 гг.), Приаральско-Каракумского (1 штамм от большой песчанки, 1945 г.), Кызылкумского (1 штамм от человека, 1924 г.), Прибалхашского (2 штамма от большой песчанки, 1939 и 1961 гг.). Использованы также штаммы из очагов Прикаспия – Прикаспийского Северо-Западного степного (1 штамм от малого суслика, 1924 г.), Волго-Уральского степного (2 штамма: от человека, 1932 г. и от малого суслика, 1992 г.), Волго-Уральского песчаного (2 штамма: от верблюда, 1917 г. и от полуденной песчанки, 2002 г.) и Кавказа – Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы (1 штамм от горного суслика, 1986 г.) (таблица). Все 24 штамма обладали типичными для очагов Прикаспия и пустынных очагов Центральной Азии свойствами. Они не ферментировали рамнозу, не редуцировали нитраты, но ферментировали глицерин и арабинозу и по комплексу этих дифференциальных биохимических свойств относились к средневековому биовару основного подвида возбудителя чумы. Все штаммы секвенированы в РосНИПЧИ «Микроб». Часть из них депонирована в международной генетической базе данных NCBI GenBank (таблица). В рамках этой работы в NCBI GenBank опубликованы геномы трех штаммов из Каракумского пустынного очага: *Y. pestis* 693 (человек, 1949 г.) – № JABWNN000000000, *Y. pestis* 153 (большая песчанка, 1964 г.) – № JABWNI000000000 и М-525 (большая песчанка, 1970 г.) – № JABWHG000000000.

При построении дендрограммы также использованы штаммы *Y. pestis* других филогенетических линий из разных очагов мира, последовательности которых взяты из базы данных NCBI GenBank. К ним относятся *Pestoides F* (кавказский подвид), *Pestoides A* (алтайский биовар центрально-азиатского подвида), 620024 (тибетский подвид), C092 (восточный биовар основного подвида), 351001 (античный биовар основного подвида), KIM10 (средневековый биовар основного подвида, филогенетическая ветвь 2.MED1), 91 (средневековый биовар основ-

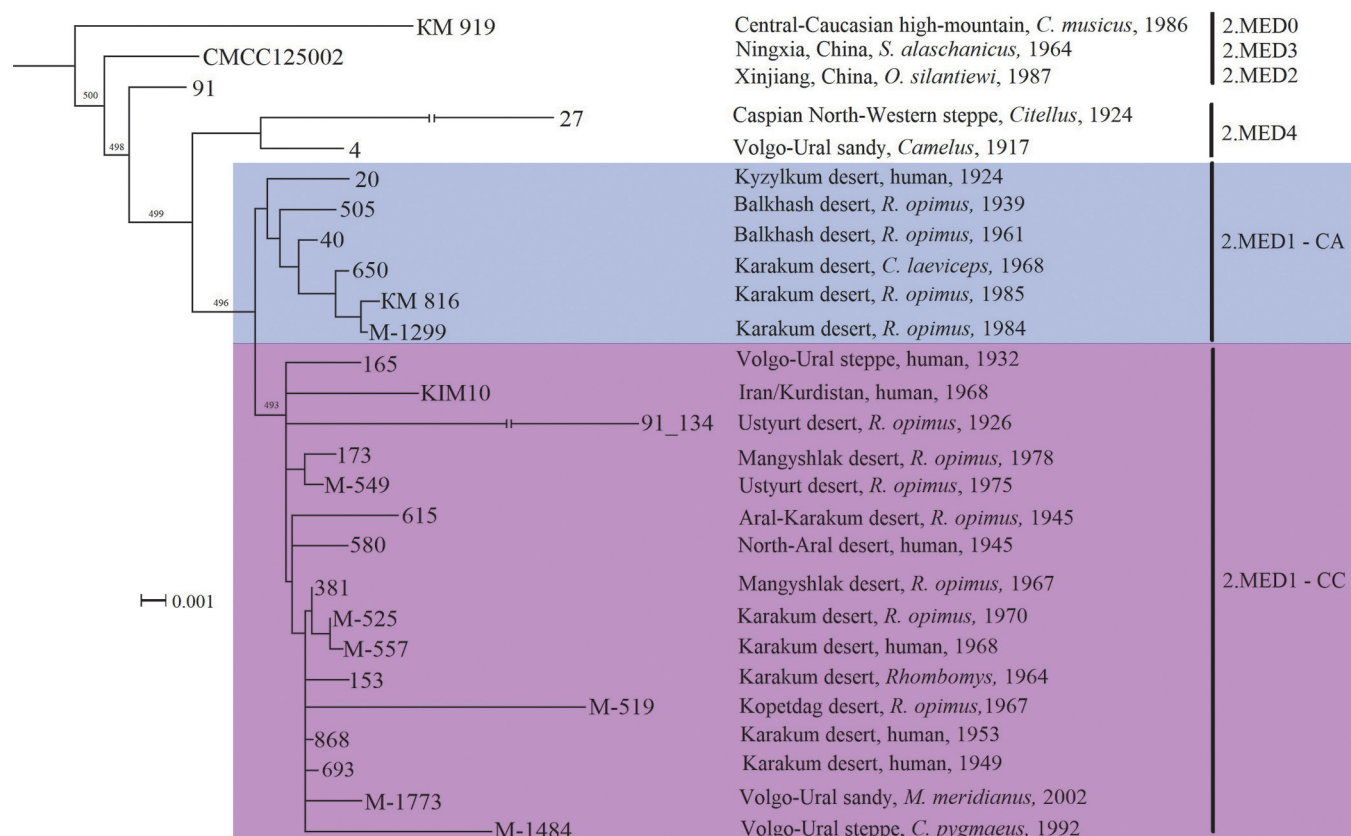
ного подвида, филогенетическая ветвь 2.MED2), CMCC125002 (средневековый биовар основного подвида, филогенетическая ветвь 2.MED3). По данным полногеномного SNP анализа этих 32 штаммов на основе найденных 1720 полиморфных нуклеотидов (SNPs) проведен филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* из Каракумского пустынного очага (рисунок).

Все 8 штаммов из Каракумского пустынного очага вошли в состав ветви 2.MED1 средневекового биовара, однако пять из них вошли в каспийскую подветвь ветви 2.MED1, а три – в ее центрально-азиатскую подветвь. Штаммы, отошедшие к каспийской подветви (М-525, М-557, 153, 693 и 868), выделены в период с 1949 по 1970 год, включая три штамма от человека, два – от большой песчанки. Очевидно, что они являлись этиологическими агентами вспышек и случаев чумы, имевших место в 1949, 1953 и 1968 гг. в Красноводской и Ашхабадской областях Туркменистана. На дендрограмме этим штаммам предшествуют штаммы из Северного Приаралья – штамм 580 (от человека, 1945 г.) из Северо-Приаральского пустынного очага и штамм 615 (от большой песчанки, 1945 г.) из Приаральско-Каракумского пустынного очага. Это означает, что штаммы из Каракумского очага 1949–1970 гг. не являются прямыми потомками штаммов *Y. pestis* из Северного Прикаспия, вызвавших там вспышки чумы в начале XX в. По данным филогенетического анализа, их ближайшие предшественники – штаммы из Северного Приаралья 1945 г. Из этого следует, что Каракумский пустынный очаг, а также Копетдагский пустынный очаг (штамм М-519 от большой песчанки, 1967 г.) заселены в середине XX столетия популяцией 2.MED1, пришедшей в Восточный Прикаспий из Северного Приаралья. В то же время из дендрограммы следует, что штаммы из двух других очагов Восточного Прикаспия – Устюртского (штаммы 91(134) и М-549 от большой песчанки, 1926 и 1975 гг.) и Мангышлакского (штамм 173 от большой песчанки, 1978 г.) принадлежат к каспийской подветви 2.MED1, составленной в основном штаммами первой половины XX в. Это доказывает, что данная популяция сохранилась здесь и во второй половине XX в., когда ее штаммы уже не выделялись на исходных территориях – в Северо-Западном и Северном Прикаспии.

Три других исследованных штамма из Каракумского пустынного очага – 650 (от блох *Ceratophyllus laeviceps*, 1968 г.), М-1299 и КМ816 (от большой песчанки, 1984–1985 гг.) вошли в центрально-азиатскую подветвь 2.MED1, точное происхождение которой неизвестно. Наиболее ранним ее представителем является штамм 20 из Кызылкумского пустынного очага (человек, вспышка в с. Ак-Камыш, 1924 г.). За ним следуют штаммы из Прибалхашского пустынного очага – 505 (большая песчанка, 1939 г.) и 40 (большая песчанка, 1961 г.). На дендрограмме эти штаммы предшествуют штам-

Происхождение и характеристика использованных в работе штаммов *Y. pestis*
Origin and characteristics of *Y. pestis* strains utilized for the study

№ No	Штамм Strain	Природный очаг, место выделения Natural focus, site of isolation	Источник, год Source, year	Филогенетическая ветвь, № депонирования в NCBI GenBank Phylogenetic branch, access No into NCBI GenBank
1	KM919	Центрально-Кавказский высокогорный, Кабардино-Балкарская АССР, вблизи г. Кызы-Кол Central-Caucasian high-mountain focus, Kabardino-Balkarian Autonomous Soviet Socialist Republic (ASSR), nearby Kyzyl-Kol city	<i>Spermophilus musicus</i> , 1986	2.MED0 № MBSI00000000
2	27	Прикаспийский Северо-Западный степной, Ростовская обл., Заветнинский р-н Precaspian North-Western steppe focus, Rostov Region, Zavetninsky District	<i>Spermophilus pygmaeus</i> , 1924	2.MED4
3	165	Волго-Уральский степной, Уральская обл., Кзыл-Кугинский р-н Volga-Ural steppe focus, Ural Region, Kyzyl-Kuginsky District	Человек, 1932 Human, 1932	2.MED1
4	M-1484	Волго-Уральский степной, Калмыцкий ПЧО Volga-Ural steppe focus, Kalmyk Plague Control Division	<i>Spermophilus pygmaeus</i> , 1992	2.MED1 № LQAV00000000
5	4	Волго-Уральский песчаный, Западный Казахстан Volga-Ural sandy focus, West Kazakhstan	Верблюд, 1917 Camel, 1917	2.MED4
6	M-1773	Волго-Уральский песчаный, Красноярский р-н Volga-Ural sandy focus, Krasnoyarsk Region	<i>Meriones meridianus</i> , 2002	2.MED1 № LYM00000000
7	91(134)	Устьуртский пустынный, Западный Казахстан, Адаевская обл., Мангышлакский уезд Ustyurtsky desert focus, West Kazakhstan, Adaevskaya Region, Mangyshlak District	<i>Rhombomys opimus</i> , 1926	2.MED1
8	M-549	Устьуртский пустынный, Туркмения, Красноводская обл. Ustyurtsky desert focus, Turkmenia, Krasnovodsk Region	<i>Rhombomys opimus</i> , 1975	2.MED1 № LQBA00000000
9	580	Северо-Приаральский пустынный, Казахстан, Кзыл-Ординская обл., Аральский р-н, остров Бигорунди North-Aral desert focus, Kazakhstan, Kyzyl-Ordinsk Region, Aral District, Isle Bigorundi	Человек, 1945 Human, 1945	2.MED1
10	381	Мангышлакский пустынный, Ур. Жалпак-Турт-Куль Mangyshlak desert focus, Zhalpak-Turt-Kul area	<i>Rhombomys opimus</i> , 1967	2.MED1
11	173	Мангышлакский пустынный, окрестности колодца Айзискайкудук Mangyshlak desert focus, in the vicinity of a well, Ajziskajkuduk	<i>Rhombomys opimus</i> , 1978	2.MED1 № LQAZ00000000
12	615	Приаральско-Каракумский пустынный, Казахстан, Кзыл-Ординская обл. Aral-Karakum desert focus, Kazakhstan, Kyzyl-Ordinsk Region	<i>Rhombomys opimus</i> , 1945	2.MED1
13	693	Каракумский пустынный, Туркменская ССР, Кизил-Арватский р-н Karakum desert focus, Turkmen SSR, Kizil-Arvat'sky District	Человек, 1949 Human, 1949	2.MED1
14	868	Каракумский пустынный, Туркменская ССР, п. Ак-Куя Karakum desert focus, Turkmen SSR, Ak-Kuyu village	Человек, 1953 Human, 1953	2.MED1
15	153	Каракумский пустынный, Туркменская ССР, котловина Кырк-Илак Karakum desert focus, Turkmen SSR, Kyrk-Ilak Depression	Песчанка, 1964 Gerbil, 1964	2.MED1
16	M-557	Каракумский пустынный, Туркмения, Ашхабадский р-н Karakum desert focus, Turkmenia, Ashkhabad District	Человек, 1968 Human, 1968	2.MED1
17	650	Каракумский пустынный, Чиплийский р-н Karakum desert focus, Chipliysky District	<i>Ceratophyllus laeviceps</i> , 1968	2.MED1
18	M-525	Каракумский пустынный, Туркмения, Ашхабадская обл., Каахкинский р-н Karakum desert focus, Turkmenia, Ashkhabad Region, Kaakhkinsky District	<i>Rhombomys opimus</i> , 1970	2.MED1
19	KM816	Каракумский пустынный, Туркменская ССР, Красноводская обл., Красноводский р-н Karakum desert focus, Turkmen SSR, Krasnovodsk Region, Krasnovodsk District	<i>Rhombomys opimus</i> , 1985	2.MED1 № LPXU00000000
20	M-1299	Каракумский пустынный, Туркменская ССР, Красноводская обл., Красноводский р-н Karakum desert focus, Turkmen SSR, Krasnovodsk Region, Krasnovodsk District	<i>Rhombomys opimus</i> , 1984	2.MED1
21	M-519	Копетдагский пустынный, Туркмения, р-н Кизыл-Атрекский, окрестности водохранилища Хау Гуч Kopetdag desert focus, Turkmenia, Kizyl-Atreksky District, vicinity of the Khau Guch reservoir	<i>Rhombomys opimus</i> , 1967	2.MED1 № LQAX00000000
22	20	Кызылкумский пустынный, Туркестан, ур. Ак Камыш Kyzylkum desert, Turkestan, Ak Kamysh tract	Человек, 1924 Human, 1924	2.MED1
23	505	Прибалхашский пустынный, Алма-Атинская обл., Джаркентский р-н Pre-Balkhash desert focus, Alma-Ata Region, Dzhar'kent'sky District	<i>Rhombomys opimus</i> , 1939	2.MED1
24	40	Прибалхашский пустынный, Талды-Курганская обл. Pre-Balkhash desert focus, Taldy-Kurgansk Region	<i>Rhombomys opimus</i> , 1961	2.MED1



Филогенетический анализ *Y. pestis* из Каракумского пустынного очага, сопредельных очагов Прикаспия, Центральной Азии и других очагов мира на основе выявленных 1720 коровых SNPs по данным полногеномного секвенирования 32 штаммов. Построение дендрограммы осуществляли с использованием программы PhyML 3.1 методом Maximum Likelihood с моделью нуклеотидных замен GTR, с 500-бутстреп поддержкой. Для повышения качества разрешения на рисунке приведен фрагмент дендрограммы, содержащий только штаммы средневекового биовара:

2.MED1-CA – центрально-азиатская подветвь 2.MED1, 2.MED1-CC – каспийская подветвь

Phylogenetic analysis of *Y. pestis* strains from Kara Kum desert focus, neighboring foci of Caspian Sea region, Central Asia and other foci of the world based on 1720 core SNPs identified through whole genome sequencing of 32 strains. Tree diagram construction was performed by means of PhyML v. 3.1 software using Maximum Likelihood method with nucleotide substitution model GTR, with 500-bootstrap support. In order to enhance the quality of resolution, the figure shows the part of the dendrogram containing only the strains of medieval biovar:

2.MED1-CA – Central Asian sub-branch of 2.MED1, 2.MED1-CC – Caspian sub-branch

мам 1968, 1984 и 1985 гг. из Каракумского песчаного очага. Это позволяет предположить, что штаммы центрально-азиатской подветви 2.MED1, ранее пришедшие в Кызылкумский пустынный очаг и проникшие в Прибалхашье, к середине второй половины XX в. на фоне благоприятных климатических условий распространились на территорию Каракумского очага и укоренились в биоценозе этого очага.

Таким образом, Каракумский пустынный очаг на протяжении XX в. пережил 3 волны распространения *Y. pestis*. Первая волна представлена вспышкой чумы в ауле Чайрук (окрестности г. Мары) в 1912 г., происхождение которой и филогенетическая принадлежность этиологического агента неизвестны. По-видимому, эта первая волна не сопровождалась образованием устойчивого очага чумы, поскольку эпизоотическая активность в Каракумском очаге обнаружена позже – лишь в 1949 г., после второй волны распространения на данной территории штаммов 2.MED1 из Северного Приаралья. Третья волна *Y. pestis* связана с распространением

в Каракумском очаге центрально-азиатской подветви 2.MED1, пришедшей из Прибалхашья в середине второй половины XX в. Полученные данные свидетельствуют об активных процессах экспансии *Y. pestis* средневекового биовара в северной и южной подзоне пустынь Евразии в XX в., вызванных циклическими изменениями климата. Эти результаты открывают перспективу реконструкции и прогнозирования пространственно-временной циркуляции возбудителя чумы в природных очагах Восточной Европы и Центральной Азии на основе комплексного анализа вновь полученных с помощью современных генетических технологий филогенетических данных, а также ранее накопленных при многолетнем проведении мониторинга природных очагов чумы специалистами противочумной системы эпизоотологических и эпидемиологических данных.

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. 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 «Амрит»; 2016. 248 с.
3. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiry A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96:14043–8. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14043.
4. Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Diehl I., Kusecek B., Vogler A.J., Wagner D.M., Allender C.J., Easterday W.R., Chenal-Francisque V., Worsham P., Thomson N.R., Parkhill J., Lindler L.E., Carniel E., Keim P. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(51):17837–42. DOI: 10.1073/pnas.0408026101.
5. Haensch S., Bianucci R., Signoli M., Rajerison M., Schultz M., Kacki S., Vermunt M., Weston D.A., Hurst D., Achtman M., Carniel E., Bramanti B. Distinct clones of *Yersinia pestis* caused the Black Death. *PLoS Pathog.* 2010; 6(10):e1001134. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001134.
6. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3. DOI: 10.1038/ng.705.
7. Cui Y., Song Y. Genome and evolution of *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 918:171–92. DOI: 10.1007/978-94-024-0890-4_6.
8. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Lucy A., Weinert W., 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.
9. Demeure C.E., Dussurget O., Fiol G.M., Le Guern A.-S., Savin C., Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Genes Immun.* 2019; (5):357–70. DOI: 10.1038/s41435-019-0065-0.
10. Kutyrev 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.
11. Eroshenko G.A., Popov N.V., Alkhova Zh.V., Kukleva L.M., Balykova A.N., Grazhdanov A.K., Ayazbaev T.Z., Maikanov N.S., Kutyrev V.V. Dissemiation 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. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-48-55.
12. Eroshenko G.A., Popov N.V., Alkhova Zh.V., Balykova A.N., Kukleva L.M., Chervyakova N.S., Maykanov N.S., Sarmul'dina A.Kh., Kutyrev V.V. Circulation of *Yersinia pestis* in the Volga-Ural Sandy Focus: Spatiotemporal Analysis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:51–7. (In English). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-51-57.
13. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

References

1. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia, and Siberia]. Moscow: "Meditsina"; 2004. 191 p.
2. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., editors. [Cadastre of Epidemic and Epizootic Manifestations of Plague in the Territory of the

Russian Federation and Former Soviet Union (1876–2016)]. Saratov: "AMIRIT" LLC; 2016. 248 p.

3. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiry A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96:14043–8. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14043.

4. Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Diehl I., Kusecek B., Vogler A.J., Wagner D.M., Allender C.J., Easterday W.R., Chenal-Francisque V., Worsham P., Thomson N.R., Parkhill J., Lindler L.E., Carniel E., Keim P. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(51):17837–42. DOI: 10.1073/pnas.0408026101.

5. Haensch S., Bianucci R., Signoli M., Rajerison M., Schultz M., Kacki S., Vermunt M., Weston D.A., Hurst D., Achtman M., Carniel E., Bramanti B. Distinct clones of *Yersinia pestis* caused the Black Death. *PLoS Pathog.* 2010; 6(10):e1001134. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001134.

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

7. Cui Y., Song Y. Genome and evolution of *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 918:171–92. DOI: 10.1007/978-94-024-0890-4_6.

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

9. Demeure C.E., Dussurget O., Fiol G.M., Le Guern A.-S., Savin C., Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Genes Immun.* 2019; (5):357–70. DOI: 10.1038/s41435-019-0065-0.

10. Kutyrev 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.

11. Eroshenko G.A., Popov N.V., Alkhova Zh.V., Kukleva L.M., Balykova A.N., Grazhdanov A.K., Ayazbaev T.Z., Maikanov N.S., Kutyrev V.V. Dissemiation 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. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-48-55.

12. Eroshenko G.A., Popov N.V., Alkhova Zh.V., Balykova A.N., Kukleva L.M., Chervyakova N.S., Maykanov N.S., Sarmul'dina A.Kh., Kutyrev V.V. Circulation of *Yersinia pestis* in the Volga-Ural Sandy Focus: Spatiotemporal Analysis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:51–7. (In English). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-51-57.

13. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: "Shiko" CJSC; 2013. 560 p.

Authors:

Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Alkhova Zh.V., Balykova A.N., Popov N.V., Krasnov Ya.M., Chervyakova N.S., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

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

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-62-69

УДК 616.98:579.841.95

А.С. Карцева, О.В. Калмантаева, М.В. Силкина, Т.И. Комбарова, В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич,
В.В. Фирстова

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОГЕННЫХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск, Российская Федерация

Francisella tularensis является внутриклеточной бактерией, вызывающей туляремию. Прогресс в создании безопасной и эффективной вакцины для профилактики туляремии затруднен из-за недостатка знаний об иммунологических параметрах, отражающих защитный адаптивный иммунитет. **Целью** исследований являлась оценка влияния модификаций генома *F. tularensis* 15 НИИЭГ на иммуногенные и протективные свойства штаммов *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA и *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA. **Материалы и методы.** Многопараметрическая проточная цитометрия и измерение секретируемых цитокинов использованы для характеристики реакций лимфоцитов селезенки мышей на рестимуляцию кислотонерастворимым комплексом *F. tularensis* в системе *in vitro*, также проведен анализ титров специфических антител к липополисахариду *F. tularensis* в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. **Результаты и обсуждение.** В работе показано, что иммунизация исследуемыми штаммами приводила к достоверному увеличению CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток, способных экспрессировать функциональные маркеры CD69, CD25 и/или CD28, а также к увеличению субпопуляции Т-хелперов, синтезирующих IFN-γ. В организме иммунных мышей формировался пул В-лимфоцитов, способных секретировать IFN-γ в ответ на их стимуляцию кислотонерастворимым комплексом. Иммунизация штаммом 15/23-1/sodBΔrecA обеспечивала 70 % защиту у мышей от интраназального заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* SchuS4. Более выраженные протективные свойства связаны с активацией не только В-лимфоцитов и Т-хелперов, но также с одновременной активацией цитотоксических Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: туляремия, вакцина, Т-лимфоциты, цитокины, В-лимфоциты, протективность.

Корреспондирующий автор: Карцева Алена Сергеевна, e-mail: kartseva_as@mail.ru.

Для цитирования: Карцева А.С., Калмантаева О.В., Силкина М.В., Комбарова Т.И., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Фирстова В.В. Характеристика иммуногенных и протективных свойств модифицированных вариантов штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 3:62–69. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-62-69

Поступила 02.04.20. Отправлена на доработку 24.04.20. Принята к публ. 16.06.20.

A.S. Kartseva, O.V. Kalmantaeva, M.V. Silkina, T.I. Kombarova, V.M. Pavlov, A.N. Mokrievich,
V.V. Firstova

Characterization of Immunogenic and Protective Properties of the Modified Variants of the Strain *Francisella tularensis* 15 NIEG

State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Abstract. *Francisella tularensis* is an intracellular bacterium that causes tularemia. Progress in creating a safe and effective vaccine for the prevention of tularemia is challenging due to a lack of knowledge about immunological parameters indicative of protective adaptive immunity. **Objective** of the research was to assess the effect of modifications of the *F. tularensis* 15 NIEG genome on the immunogenic and protective properties of *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA and *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA strains. **Materials and methods.** Multi-parameter flow cytometry and the measurement of secreted cytokines were used to characterize the responses of mouse spleen lymphocytes in response to re-stimulation of *F. tularensis* with acid-insoluble complex (AIC) *in vitro*. Also, the titers of specific antibodies to *F. tularensis* lipopolysaccharide in blood serum were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results and discussion.** It has been shown that immunization with the studied strains led to a significant increase in CD4⁺ and/or CD8⁺ T cells capable of expressing functional markers: CD69, CD25 and/or CD28; an increase in the subpopulation of T-helpers synthesizing IFN-γ. In the body of immune mice, a pool of B-lymphocytes was formed, capable of secreting IFN-γ in response to their stimulation with AIC. Immunization with the strain 15/23-1/sodBΔrecA provided 70% protection in mice from intranasal infection with a virulent strain of *F. tularensis* SchuS4. More pronounced protective properties were associated with the activation of not only B-lymphocytes and T-helpers, but also with the simultaneous activation of cytotoxic T-lymphocytes.

Key words: tularemia, vaccine, T-lymphocytes, cytokines, B-lymphocytes, protectivity.

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

Corresponding author: Kartseva Alyena Sergeevna, e-mail: kartseva_as@mail.ru.

Citation: Kartseva A.S., Kalmantaeva O.V., Silkina M.V., Kombarova T.I., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Firstova V.V. Characterization of Immunogenic and Protective Properties of the Modified Variants of the Strain *Francisella tularensis* 15 NIEG. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2020; 3:62–69. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-62-69

Received 02.04.20. Revised 24.04.20. Accepted 16.06.20.

Kartseva A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3159-6439>
Kalmantaeva O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2838-6879>
Silkina M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5329-2807>
Kombarova T.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1959-1739>
Pavlov V.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9107-5304>
Mokrievich A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3675-8780>
Firstova V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9898-9894>

Тюляремия – особо опасная инфекция, являющаяся природно-очаговым зоонозом. Этиологический агент этой инфекции – грамотрицательная коккобацилла *Francisella tularensis*. Вакцинопрофилактику туляремии на территории России проводят вакциной туляремиальной живой сухой, созданной на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [1]. Живая туляремиальная вакцина формирует длительный иммунитет против туляремии, но характеризуется умеренной реактогенностью и определенной генетической нестабильностью [2]. В связи с этим на основе *F. tularensis* 15 НИИЭГ сконструированы два новых штамма: *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA [3] и *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA, у которых удалена одна копия гена *iglC* и делегирован ген *recA*. У штамма *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA дополнительно модифицирован ген *sodB* [4]. Удаление одной копии гена *iglC* из штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и модификация гена *sodB* привели к снижению способности бактерий размножаться в макрофагах, а делеция гена *recA* стабилизировала геном за счет снижения вероятности гомологичной рекомбинации в клетках *F. tularensis* [2].

Целью наших исследований явилась оценка влияния модификаций генома *F. tularensis* 15 НИИЭГ на иммуногенные и протективные свойства штаммов *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA и *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA.

Материалы и методы

Исследования проведены на базе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Бактериальные штаммы. Штаммы, использованные в работе, предоставлены Государственной коллекцией патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболонск) (таблица).

Бактериальные штаммы

Bacterial strains

Название Name	Характеристика Characteristics
<i>F. tularensis</i> 15 линии НИИЭГ <i>F. tularensis</i> 15 NIEG	subsp. <i>holarctica</i> , вакцинный штамм subsp. <i>holarctica</i> , vaccine strain
<i>F. tularensis</i> 15/23-1ΔrecA	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ с инактивированной одной из двух копий гена <i>iglC</i> и делегированным геном <i>recA</i> <i>F. tularensis</i> 15 NIEG with an inactivated <i>iglC</i> gene copy and deleted <i>recA</i> gene
<i>F. tularensis</i> 15/23-1/sodBΔrecA	<i>F. tularensis</i> 15/23-1ΔrecA с модифицированным геном <i>sodB</i> <i>F. tularensis</i> 15/23-1ΔrecA with modified <i>sodB</i> gene

Экспериментальные животные. Для проведения исследований использованы мыши линии BALB/c (питомник «Пушино», ФИБХ РАН, г. Пушино). Масса мышей составляла 18–20 г, возраст – 6–8 недель. Все стадии исследования соответствовали законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения.

Иммунизация. Мышей иммунизировали однократно, подкожно в дозе 10² КОЕ/мл штаммами *F. tularensis*. В качестве контроля выступала группа интактных мышей.

Оценка иммуногенной активности. На 30-е сутки после иммунизации проводили эвтаназию животных, получали кровь для выделения сыворотки и селезенку для выделения субпопуляции лимфоцитов на градиенте плотности Histopaque-1,077 (Sigma, США).

Антигены. Для специфической стимуляции использовали препараты: кислотонерастворимый комплекс (КНК) *F. tularensis* 15 НИИЭГ [5, 6] и липополисахарид (ЛПС) *F. tularensis*.

Определение антител в сыворотке крови к ЛПС *F. tularensis*. В сыворотке крови мышей определяли уровень титров антител IgG к ЛПС *F. tularensis* методом твердофазного иммуноферментного анализа с адсорбцией антигена по 10 мкг/мл в 96-луночных плоскодонных планшетах. Учет результатов проводили на приборе Thermo Scientific Varioskan Flash (Thermo Scientific, США) при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля выступала сыворотка интактных мышей.

Определение специфической активации лимфоцитов. Экспрессию поверхностных маркеров и синтез цитокинов оценивали на лимфоцитах, выделенных из селезенки, в системе *in vitro* после их рестимуляции КНК *F. tularensis* в концентрации 10 мкг/мл. Отрицательным контролем выступали клетки, инкубируемые в среде в отсутствие антигена. Лимфоциты инкубировали при температуре 37 °С, во влажной атмосфере, 5 % углекислого газа (CO₂). Анализ уровня экспрессии CD69 молекулы на поверхности лимфоцитов и содержания внутриклеточных цитокинов IFN-γ и IL-4 проводили через 24 ч после инкубации; экспрессию CD25 молекулы и уровень IFN-γ в клеточном супернатанте анализировали через 48 ч после инкубации.

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов. Субпопуляционный состав лимфоцитов определяли с использованием следующих комбинаций моноклональных антител: активированные цитотоксические Т-лимфоциты и Т-хелперы – CD3 FITC, CD4 APC, CD69 PE, CD25 PerCP-cy5.5, CD28

PerCP-су5.5; активированные В-лимфоциты – CD19 APC, CD69 FITC, CD25 PerCP-су5.5 (eBioscience, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлюориметре FACS Aria III (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva (версия 8.0). В каждом образце анализировали 10000 событий по гейту лимфоцитов.

Анализ продукции IFN- γ и IL-4 лимфоцитами. Уровень внутриклеточного содержания IFN- γ и IL-4 в субпопуляциях Т- и В-клеток определяли согласно руководству [2]. Далее лимфоциты окрашивали моноклональными антителами – CD3 FITC, CD8 APC, CD19 APC, IFN- γ PerCP-су5.5 и IL-4 PE (eBioscience, США), после этого образцы фиксировали в 1 % растворе формалина и анализировали на проточном цитофлюориметре. Уровень цитокина IFN- γ в клеточном супернатанте определяли методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа согласно инструкции производителя (BD Biosciences, США).

Определение протективной активности штаммов. Для определения протективной активности штаммов через 30 дней после иммунизации мышам интраназально вводили тест-заражающий вирулентный штамм Schu *F. tularensis* в дозе $3 \cdot 10^3$ КОЕ/мл. В качестве контроля выступала группа интактных мышей. За животными наблюдали 21 день, оценивая их падеж.

Статистические методы. Систематизация исходной информации, визуализация полученных результатов и статистическая обработка осуществлялись при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 6.00 for Windows (GraphPad Software Inc., США). Данные по титрам антител в сыворотке крови и цитокинам в клеточном супернатанте выражали при помощи среднеарифметического значения группы и его стандартного отклонения. Статистическое сравнение проводили с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса (при $p < 0,05$). Результаты цитометрических данных описывались в виде процента клеток от искомой субпопуляции и приводили как медиану и интерквартильный размах (Me (Q25:Q75)). Статистическое

сравнение данных между стимулированными КНК *F. tularensis* и нестимулированными клетками проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни (при $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Уровень IgG-специфических антител в сыворотке крови. На 30-е сутки после иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными (штаммами 15/23-1 Δ recA или 15/23-1/sodB Δ recA) во всех группах животных появлялись IgG антитела к ЛПС *F. tularensis* (рис. 1). Сравнительный анализ показал, что значения титров антител IgG к ЛПС *F. tularensis* в сыворотке крови достоверно не различались ($p = 0,665$) между группами вакцинированных животных.

Анализ изменения экспрессии маркеров активации в субпопуляции В-лимфоцитов, стимулированных КНК in vitro. Иммунизация мышей штаммом 15 НИИЭГ приводила к активации В-лимфоцитов, о чем свидетельствовало достоверное увеличение уровня экспрессии CD69 и CD25 молекулы: процентное содержание В-клеток с фенотипом CD19⁺CD69⁺ увеличивалось при рестимуляции КНК *F. tularensis* по сравнению с нестимулированными клетками – 1,27 % (1,0; 2,27) и 15,70 % (12,05; 24,4) соответственно при $p = 0,007$; процентное содержание CD19⁺CD25⁺ клеток увеличивалось при рестимуляции КНК *F. tularensis* по сравнению с нестимулированными клетками этой же группы – 3,2 % (1,5; 4,75) и 21,4 % (13,50; 31,4) соответственно при $p = 0,007$. Данные представлены на рис. 2. В группе мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1 Δ recA, также наблюдалось достоверное увеличение уровня экспрессии CD69 – с 1,2 % (0,35; 1,65) до 8,5 % (6,23; 13,75) при $p = 0,007$ и CD25 – с 3,1 % (2,30; 3,71) до 25,8 % (15,5; 33,25) при $p = 0,008$ молекул в системе in vitro после рестимуляции лимфоцитов КНК *F. tularensis*. В группе мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodB Δ recA, наблюдалось увеличение только субпопуляции CD19⁺CD25⁺ лимфоцитов – с 5,6 % (3,95; 12,98) до 23,6 % (17,95;

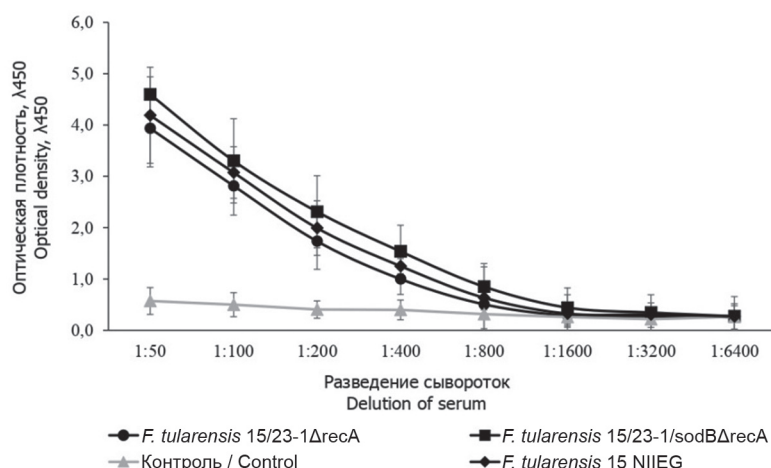


Рис. 1. Титры IgG антител к ЛПС *F. tularensis* в крови животных на 30-е сутки иммуногенеза

Примечания: результаты представлены в виде среднеарифметического значения группы и его стандартного отклонения. Для сравнения выборок использовался непараметрический критерий Краскела – Уоллиса.

Fig. 1. Titers of IgG antibodies to *F. tularensis* LPS in the blood of animals on the 30th day of immunogenesis

Note: The results are presented as the arithmetic mean of the group and its standard deviation. To compare the samples the non-parametric Kruskal – Wallis test was used.

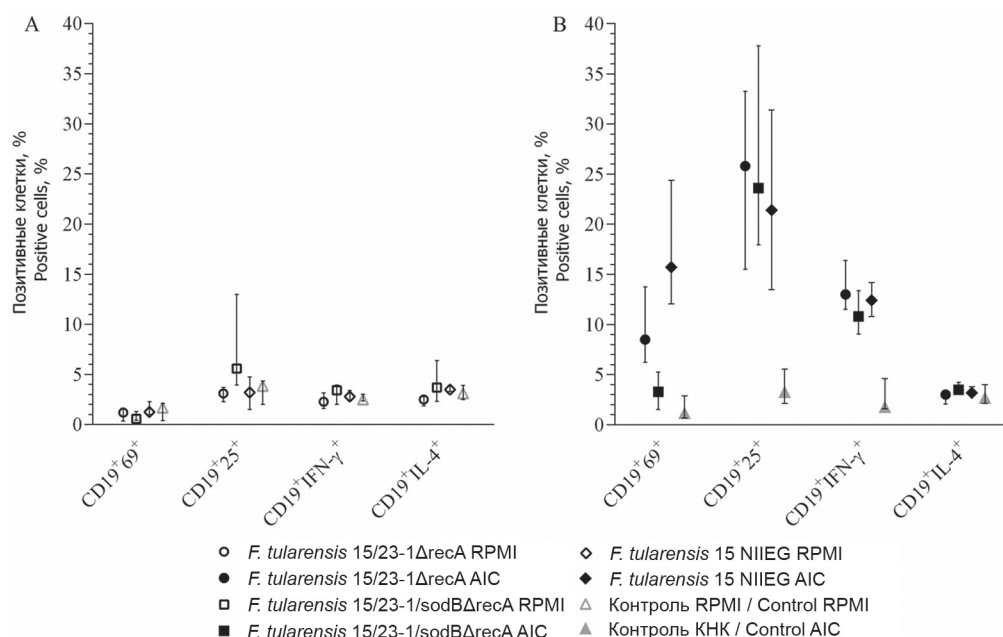


Рис. 2. Спонтанное (А) и индуцированное КНК *F. tularensis* (В) изменение процентного содержания активированных В-лимфоцитов мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis*

Примечания: незаштрихованный маркер – содержание клеток, инкубированных в среде (RPMI) в отсутствие антигена; заштрихованный маркер – содержание клеток, стимулированных *in vitro* КНК. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Me (Q25:Q75)]. Для сравнения выборок использовался непараметрический критерий Манна – Уитни.

Fig. 2. Spontaneous (A) and induced by *F. tularensis* acid-insoluble complex (AIC) (B) change in the percentage of activated B-lymphocytes of mice immunized with *F. tularensis* strains

Notes: unshaded marker – the content of cells incubated in the medium (RPMI) in the absence of antigen; shaded marker – the content of cells stimulated *in vitro* by AIC. The results are presented as median and interquartile range [Me (Q25: Q75)]. Statistical analysis was performed using Mann – Whitney U test.

37,81) при $p=0,008$, достоверного увеличения CD69⁺ В-лимфоцитов после их рестимуляции *in vitro* не выявлено ($p=0,061$).

Сравнительный анализ уровня синтеза IFN-γ и IL-4 В-лимфоцитами, стимулированными КНК *in vitro*. В группе интактных мышей под влиянием КНК не происходило достоверного увеличения В-лимфоцитов, синтезирующих IFN-γ ($p=0,667$) или IL-4 ($p=0,595$) (рис. 2). Во всех группах иммунизированных мышей добавление КНК к полученным от животных В-лимфоцитам приводило к увеличению процентного содержания IFN-γ-синтезирующих клеток: после иммунизации штаммом 15 НИИЭГ увеличивалось с 2,8 % (2,35; 3,40) до 12,4 % (10,8; 14,20) при $p=0,007$; после иммунизации штаммом 15/23-1ΔrecA – с 2,28 % (1,60; 3,15) до 13,0 % (11,53; 16,40) при $p=0,007$; после иммунизации 15/23-1/sodBΔrecA – с 3,41 % (2,0; 3,95) до 10,8 % (9,05; 13,38) при $p=0,007$. Достоверного увеличения ($p>0,05$) процентного содержания клеток, синтезирующих IL-4, в группах иммунизированных животных после рестимуляции КНК *F. tularensis* не выявлено.

Анализ изменения экспрессии маркеров активации в субпопуляциях Т-лимфоцитов, стимулированных КНК *in vitro*. Стимуляция лимфоцитов КНК в системе *in vitro*, выделенных от мышей, иммунизированных штаммом 15 НИИЭГ и его производными: штаммами 15/23-1ΔrecA или 15/23-1/sodBΔrecA, приводила к активации Т-лимфоцитов

во всех группах иммунных животных (рис. 3). Анализ уровня экспрессии маркеров активации отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов показал, что под влиянием КНК *in vitro* достоверно возрастало относительное содержание Т-хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD69⁺ у всех иммунных мышей: у иммунизированных мышей штаммом 15 НИИЭГ с 1,56 % (1,11; 1,90) до 6,60 % (5,18; 9,95) при $p=0,007$; у иммунизированных мышей штаммом 15/23-1ΔrecA – с 0,80 % (0,52; 1,68) до 14,30 % (9,01; 19,77) при $p=0,008$; у иммунизированных мышей штаммом 15/23-1/sodBΔrecA – с 0,98 % (0,75; 2,36) до 9,80 % (5,78; 13,66) при $p=0,007$. Анализ субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов показал, что под влиянием КНК *in vitro* происходило достоверное увеличение (с 0,98 % – 0,75; 2,36 до 9,80 % – 5,78; 13,66 при $p=0,008$) клеток с фенотипом CD3⁺CD8⁺CD69⁺ только у мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodBΔrecA.

Анализ изменения экспрессии ко-стимулирующей молекулы CD28 в субпопуляциях Т-лимфоцитов, стимулированных КНК *in vitro*. В ходе дальнейших исследований проведен анализ экспрессии корецептора CD28 на поверхности Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (рис. 3). Выявлено, что под влиянием КНК, в сравнении с нестимулированными лимфоцитами этой же группы, достоверно ($p=0,016$) возрастало относительное содержание CD28⁺ Т-лимфоцитов с 20,40 % (17,75; 23,77) до

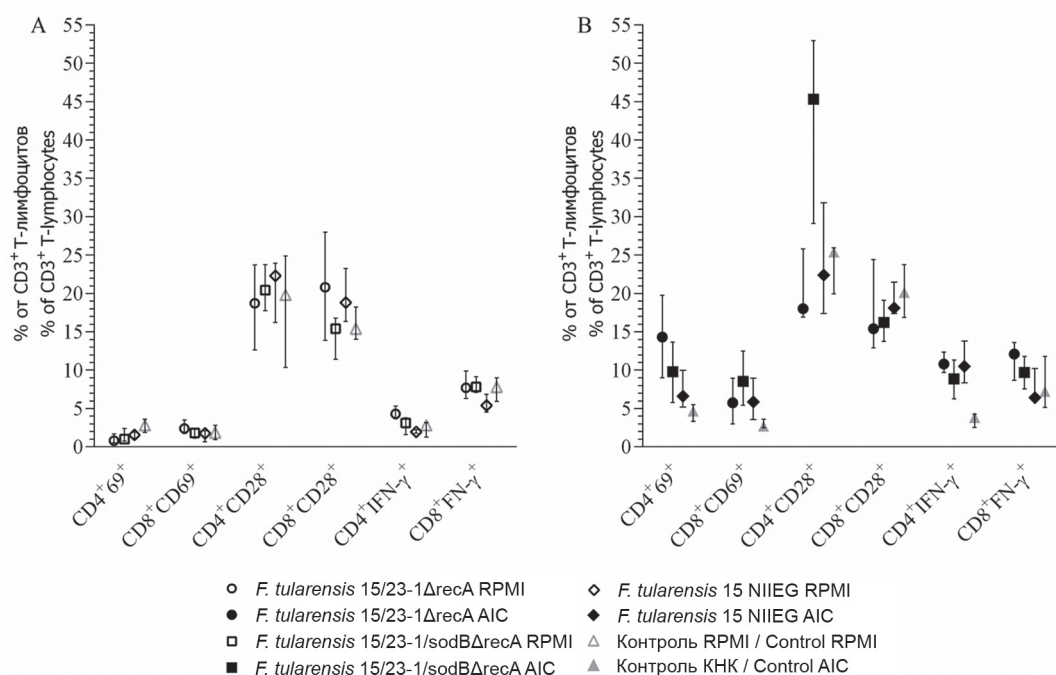


Рис. 3. Спонтанное (А) и индуцированное КНК *F. tularensis* (В) изменение процентного содержания активированных Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis*

Fig. 3. Spontaneous (A) and *F. tularensis* AIC induced (B) change in the percentage of activated T-lymphocytes of mice immunized with strains of *F. tularensis*

45,30 % (29,10; 52,95) только в группе животных, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodBΔrecA. У мышей, иммунизированных штаммами 15 НИИЭГ или 15/23-1ΔrecA, после рестимуляции *in vitro* достоверно значимых различий ($p > 0,05$) уровня экспрессии CD28 молекулы на поверхности цитотоксических лимфоцитов или Т-хелперов не выявлено.

Сравнительный анализ уровня синтеза IFN-γ и IL-4 Т-лимфоцитами, стимулированными КНК *in vitro*. В экспериментах мы анализировали количество Т-лимфоцитов, способных синтезировать IFN-γ и IL-4, под влиянием КНК (рис. 3). Сравнительный анализ полученных данных показал, что во всех группах иммунных мышей наблюдалось достоверное увеличение синтеза IFN-γ Т-хелперами, но не цитотоксическими Т-лимфоцитами: у иммунизированных 15 НИИЭГ с 1,95 % (1,75; 2,25) до 10,50 % (8,35; 13,80) при $p = 0,008$; у иммунизированных 15/23-1ΔrecA – с 4,3 % (3,65; 5,29) до 10,80 % (9,70; 12,35) при $p = 0,007$; у иммунизированных 15/23-1/sodBΔrecA – с 3,10 % (1,57; 3,75) до 8,85 % (6,26; 11,30) при $p = 0,008$. Уровень секреции IL-4 Т-клетками не изменялся под влиянием антигенов и был сопоставим с уровнем синтеза IL-4 Т-лимфоцитами, полученными из группы intactных мышей (данные не приведены).

Сравнительный анализ уровня IFN-γ и IL-4 в супернатанте. В исследуемых группах мы анализировали продукцию цитокинов IFN-γ и IL-4 в клеточном супернатанте методом ИФА (рис. 4). Во всех группах иммунизированных животных подтвердилось увеличение синтеза IFN-γ через 48 ч после рестимуляции лимфоцитов КНК *F. tularensis* и отсутствие продукции IL-4.

Выживаемость. 70 % мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodBΔrecA, выживали после интраназального заражения бактериями *F. tularensis*

Schu в дозе 1000 DCL (рис. 5). Мыши, иммунизированные штаммами 15/23-1ΔrecA и 15 НИИЭГ, были защищены от интраназального заражения *F. tularensis* Schu в меньшей степени: уровень выживаемости животных составил 30 и 50 % соответственно. Все мыши intactной группы погибали к пятым суткам после заражения.

Разработка новой вакцины против туляремии является актуальным вопросом. Это связано с остаточной реактогенностью используемой в настоящее время живой туляремийной вакцины, генетической нестабильностью и низкой степенью защиты от аэрозольного заражения туляремией. Ранее нами показано, что делеция гена *recA* и одной копии гена *iglC* в геноме бактерий штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ приводит к снижению реактогенности [2].

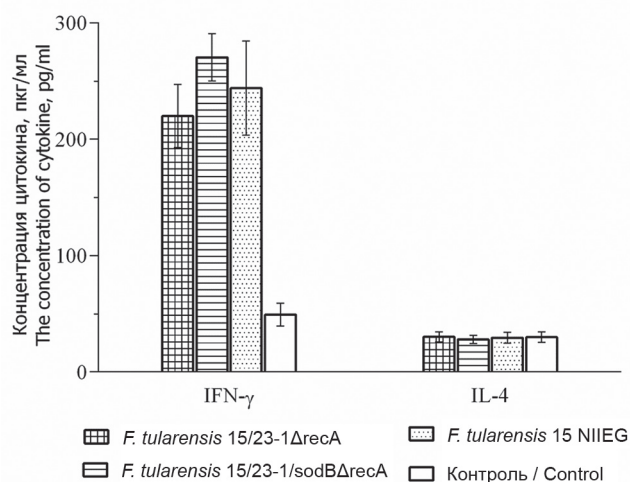


Рис. 4. Концентрация IFN-γ и IL-4 в клеточном супернатанте лимфоцитов после иммунизации штаммами *F. tularensis*

Fig. 4. The content of IFN-γ and IL-4 in the cell supernatant of lymphocytes after immunization with *F. tularensis* strains

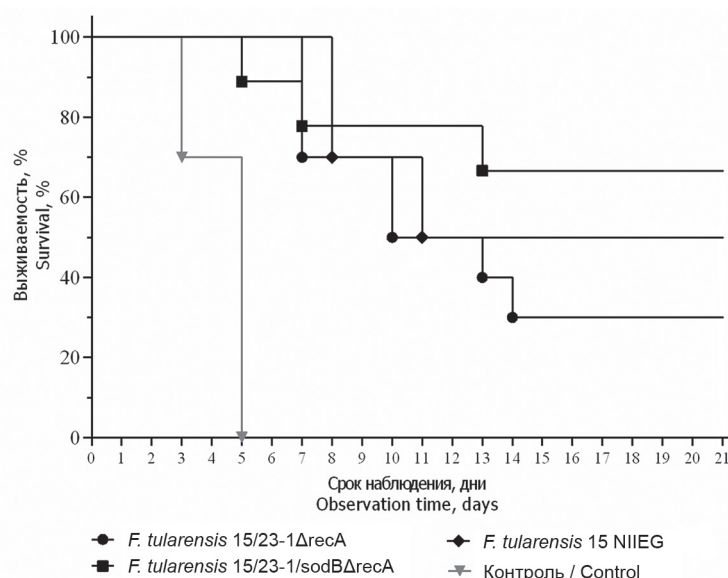


Рис. 5. Выживаемость иммунных мышей после интраназального заражения бактериями *F. tularensis* Schu в дозе 1000 DCL

Fig. 5. Survivability of immune mice after intranasal infection with bacteria *F. tularensis* Schu in a dose of 1000 DCL

В настоящих проведенных экспериментах показано, что генетические модификации туляреминого вакцинного штамма оказали влияние на уровень протективности против поствакцинального интраназального заражения вирулентным штаммом Schu *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Выживаемость иммунных животных после заражения являлась максимально высокой в группе животных, иммунизированных 15/23-1/sodBΔrecA (70 %), по сравнению с животными, иммунизированными *F. tularensis* 15 НИИЭГ (50 %) или 15/23-1ΔrecA (30 %).

Сравнительный анализ уровня специфических антител в крови животных на 30-е сутки после иммунизации разными штаммами показал, что титры антител к ЛПС *F. tularensis* достоверно не различались между группами иммунных мышей и колебались в пределах 1:400÷1:800. Известно, что антитела к антигенам *F. tularensis* играют вспомогательную роль в борьбе с инфекцией, усиливая Т-клеточный ответ посредством опсонизации бактерий [7]. В связи с тем, что большая часть жизнедеятельности бактерий (включая репликацию) проходит внутриклеточно, уровень антител не коррелирует с протективностью противотуляреминого иммунитета. Поэтому мы попытались выявить особенности специфических клеточных реакций иммунокомпетентных клеток у мышей, иммунизированных разными штаммами.

Хотя для возбудителей внутриклеточных инфекций ведущая роль принадлежит Т-клеточному звену иммунитета, эксперименты, проведенные с knock-out мышами с использованием вирулентного штамма *F. tularensis* SchuS4, показали, что выживаемость мышей при туляреминой инфекции коррелировала с участием не только Т-лимфоцитов ($\alpha\beta$ TCR⁺ и $\gamma\delta$ TCR⁺), но и В-лимфоцитов [8].

В-лимфоциты способны регулировать специфические иммунные реакции с помощью дополнительных, независимых от антител механизмов [9–11]. В наших экспериментах *in vitro* выявлено, что под влиянием КНК В-лимфоциты всех групп иммунных

животных стремительно активировались, о чем свидетельствовало увеличение пула клеток, экспрессирующих CD69 рецептор, активирующий эффекторную функцию лимфоцитов [12], и CD25 молекулу – лиганд IL-2, который при связывании усиливает пролиферативную активность клетки [13].

Формирование протективных противотуляреминых реакций зависит от наличия В-лимфоцитов, способных синтезировать IFN- γ , на ранних этапах иммунного ответа [14]. При этом необходимость участия В-лимфоцитов в формировании иммунного ответа зависит от уровня вирулентности штамма *Francisella*: чем выше вирулентность, тем более востребовано проявление эффекторной функции В-лимфоцитами [15, 16]. В ходе собственных экспериментов нами показано, что во всех группах иммунных мышей под влиянием КНК отмечалось увеличение В-лимфоцитов, синтезирующих IFN- γ , но не IL-4. Таким образом, у всех иммунных мышей уровни вовлеченности В-лимфоцитов в формирование противотуляреминого иммунитета не различались между собой.

Т-клетки играют ключевую роль в адаптивной иммунной системе, опосредуя клеточный иммунитет и организуя иммунный ответ в целом [17, 18]. Для полной активации наивных Т-лимфоцитов и инициации ответов CD4⁺ клеток памяти необходимо не только распознавание антигена через TCR-рецептор, но и дополнительная ко-стимуляция через рецептор CD28 через связывание с его лигандами CD86 или CD80, экспрессируемыми на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Связывание CD28 с его лигандами (CD80/CD86) запускает транскрипционную программу, которая обеспечивает эффективную пролиферацию и дифференцировку Т-клеток. В предыдущем исследовании мы показали, что уже на третьи сутки у мышей после иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis* наблюдается повышение уровня CD28 молекулы, что отражает усиление межклеточных взаимодействий и совпада-

ет с увеличением экспрессии CD86 на поверхности В-клеток [19]. Сравнительный анализ полученных в этой работе результатов показал, что только в группе мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodBΔrecA, выявлено достоверное увеличение под влиянием КНК Т-хелперов, экспрессирующих ко-стимулирующую молекулу CD28.

При туляреминой инфекции важна роль Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов – исключение одной из этих субпопуляций Т-лимфоцитов приводит к гибели иммунных мышей [20]. Выявлено, что только в группе мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodBΔrecA, увеличивалось количество активированных (CD69⁺) цитотоксических Т-лимфоцитов в ответ на рестимуляцию антигенами *F. tularensis*.

В ответ на рестимуляцию КНК Т-лимфоциты, полученные от всех групп иммунных мышей, синтезировали IFN-γ преимущественно за счет субпопуляции Т-хелперов. Количество синтезирующих IFN-γ Т-хелперов достоверно не различалось между группами, но общее содержание IFN-γ в супернатанте культуры клеток, стимулированных КНК, было выше в группе мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodBΔrecA. Это позволяет говорить о более активном синтезе IFN-γ другими иммунокомпетентными клетками.

Суммируя полученные результаты экспериментов, можно заключить, что более выраженный уровень защиты от интраназального заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* SchuS4 у мышей, иммунизированных 15/23-1/sodBΔrecA, по сравнению с остальными двумя штаммами может быть связан с выраженной активацией не только В-лимфоцитов и Т-хелперов, но и с одновременной активацией цитотоксических лимфоцитов.

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

Список литературы

- Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 192 с.
- Дятлов И.А., редактор. Туляремия: состояние проблемы и методы исследования. М.: Династия; 2019. 263 с.
- Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Комбарова Т.И., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Павлов В.М. Получение и иммунобиологические свойства вакцинного штамма туляреминого микроба без одной копии гена *iglC* и без гена *recA*. *Молекулярная генетика, микробиология, вирусология*. 2015; 33(3):33–9.
- Сухова М.А., Вахрамеева Г.М., Кравченко Т.Б., Мокриевич А.Н., Павлов В.М., Дятлов И.А. Конструирование и изучение свойств вариантов штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ со сниженной экспрессией гена *sodB*, кодирующего Fe-супероксиддисмутазу. *Биотехнология*. 2015; 31(4):16–27.
- Волох О.А., Кузнецова Е.М., Смолькова Е.А., Щуковская Т.Н., Бугоркова С.А., Авдеева Н.Г., Филимонова Д.Г., Шмелькова Т.П., Ключева С.Н., Никифоров А.К. Экспериментальный препарат для специфической профилактики туляремии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 2:73–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-73-77.
- Сомов А.Н., Кравченко Т.Б., Павлов В.М., Вахрамеева Г.М., Комбарова Т.И., Миронова Р.И., Фирстова В.В., Калмантаева О.В., Ветчинин С.С., Мокриевич А.Н. Антигенные и иммуногенные свойства кислотонерастворимого комплекса *Francisella*

tularensis штамма 15 НИИЭГ в растворимой, адсорбированной и микрокапсулированной формах. *Биотехнология*. 2017; 33(5):23–34. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-23-34.

7. Roberts L.M., Powell D.A., Frelinger J.A. Adaptive immunity to *Francisella tularensis* and considerations for vaccine development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:115. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00115.

8. Crane D.D., Scott D.P., Bosio C.M. Generation of a convalescent model of virulent *Francisella tularensis* infection for assessment of host requirements for survival of tularemia. *PLoS One*. 2012; 7:e33349. DOI: 10.1371/journal.pone.0033349.

9. Hurdal R., Ndlovu H.H., Revaz-Breton M., Parihar S.P., Nono J.K., Govender M., Brombacher F. IL-4-producing B cells regulate T helper cell dichotomy in type 1- and type 2-controlled diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017; 114(40):E8430–E8439. DOI: 10.1073/pnas.1708125114.

10. Wojciechowski W., Harris D.P., Sprague F., Mousseau B., Makris M., Kusser K., Honjo T., Mohrs K., Mohrs M., Randall T., Lund F.E. Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus*. *Immunity*. 2009; 30(3):421–33. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.01.006.

11. Elkins K.L., Bosio C.M., Rhinehart-Jones T.R. Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect. Immun.* 1999; 67(11):6002–7. DOI: 10.1128/IAI.67.11.6002-6007.1999.

12. Vega-Ramos J., Alari-Pahissa E., Valle J.D., Carrasco-Marín E., Esplugues E., Borrás M., Martínez-A. C., Lauzurica P. CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunol. Cell Biol.* 2010; 88(7):707–15. DOI: 10.1038/icc.2010.62.

13. Amu S., Gjerdtsson I., Brissler M. Functional characterization of murine CD25 expressing B cells. *Scand. J. Immunol.* 2010; 71(4):275–82. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2010.02380.x.

14. Culkin S.J., Rhinehart-Jones T., Elkins K.L. A novel role for B cells in early protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS. *J. Immunol.* 1997; 158(7):3277–84. PMID: 9120284.

15. Elkins K.L., Cowley S.C., Bosio C.M. Innate and adaptive immunity to *Francisella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1105:284–324. DOI: 10.1196/annals.1409.014.

16. Cowley S.C., Elkins K.L. Immunity to *Francisella*. *Front. Microbiol.* 2011; 2:26. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00026.

17. Elkins K.L., Kurtz S.L., De Pascalis R. Progress, challenges, and opportunities in *Francisella* vaccine development. *Expert Rev. Vaccines*. 2016; 15(9):1183–96. DOI: 10.1586/14760584.2016.1170601.

18. Beyersdorf N., Kerkau T., Hünig T. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *Immunotargets Ther.* 2015; 4:111–22. DOI: 10.2147/ITT.S61647.

19. Карцева А.С., Силкина М.В., Калмантаева О.В., Миронова Р.И., Фирстова В.В., Павлов В.М., Шемякин И.Г. Сравнение раннего иммунного ответа мышей, иммунизированных туляреминым вакцинным штаммом и его производными. *Российский иммунологический журнал*. 2019; 22(3):1177–82.

20. Roberts L.M., Crane D.D., Wehrly T.D., Fletcher J.R., Jones B.D., Bosio C.M. Inclusion of epitopes that expand high-avidity CD4⁺ T cells transforms subprotective vaccines to efficacious immunogens against virulent *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* 2016; 197(7):2738–47. DOI: 10.4049/jimmunol.1600879.

References

- Olsuf'ev N.G. [Taxonomy, Microbiology, and Laboratory Diagnostics of Tularemia Agent]. Moscow: "Meditsina"; 1975. 192 p.
- Dyatlov I.A., editor. [Tularemia: status of the issue and methods of study]. Moscow: "Dinastiya"; 2019. 263 p.
- Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Mironova R.I., Kombarova T.I., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Pavlov V.M. [Production and immunobiological properties of the vaccine strain of tularemia microbe without one copy of *iglC* gene and *recA* gene]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology, and Virology]* 2015; 33(3):33–9.
- Sukhova M.A., Vakhrameeva G.M., Kravchenko T.B., Mokrievich A.N., Pavlov V.M., Dyatlov I.A. [Constructing and studies of properties of *Francisella tularensis* 15 NIIEG strain variants with attenuated expression of *sodB* gene encoding Fe-superoxidismutase]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2015; 31(4):16–27.
- Volokh O.A., Kuznetsova E.M., Smol'kova E.A., Shchukovskaya T.N., Bugorkova S.A., Avdeeva N.G., Filimonova D.G., Shmel'kova T.P., Klyueva S.N., Nikiforov A.K. [Experimental preparation for specific prophylaxis of tularemia]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; 2:73–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-73-77.

6. Somov A.N., Kravchenko T.B., Pavlov V.M., Vakhrameeva G.M., Kombarova T.I., Mironova R.I., Firstova V.V., Kalmantaeva O.V., Vetchinin S.S., Mokrievich A.N. [Antigen and immunogenic properties of acid-insoluble complex of *Francisella tularensis* 15 NIEG in soluble, adsorbed, and micro-capsular entities]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2017; 33(5):23–34. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-23-34.
7. Roberts L.M., Powell D.A., Frelinger J.A. Adaptive immunity to *Francisella tularensis* and considerations for vaccine development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:115. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00115.
8. Crane D.D., Scott D.P., Bosio C.M. Generation of a convalescent model of virulent *Francisella tularensis* infection for assessment of host requirements for survival of tularemia. *PLoS One*. 2012; 7:e33349. DOI: 10.1371/journal.pone.0033349.
9. Hurdal R., Ndlovu H.H., Revaz-Breton M., Parihar S.P., Nono J.K., Govender M., Brombacher F. IL-4-producing B cells regulate T helper cell dichotomy in type 1- and type 2-controlled diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017; 114(40):E8430–E8439. DOI: 10.1073/pnas.1708125114.
10. Wojciechowski W., Harris D.P., Sprague F., Mousseau B., Makris M., Kusser K., Honjo T., Mohrs K., Mohrs M., Randall T., Lund F.E. Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus*. *Immunity*. 2009; 30(3):421–33. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.01.006.
11. Elkins K.L., Bosio C.M., Rhinehart-Jones T.R. Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect. Immun.* 1999; 67(11):6002–7. DOI: 10.1128/IAI.67.11.6002-6007.1999.
12. Vega-Ramos J., Alari-Pahissa E., Valle J.D., Carrasco-Marin E., Esplugues E., Borràs M., Martínez-A C., Lauzurica P. CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunol. Cell Biol.* 2010; 88(7):707–15. DOI: 10.1038/icb.2010.62.
13. Amu S., Gjertsson I., Brisslert M. Functional characterization of murine CD25 expressing B cells. *Scand. J. Immunol.* 2010; 71(4):275–82. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2010.02380.x.
14. Culkin S.J., Rhinehart-Jones T., Elkins K.L. A novel role for B cells in early protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS. *J. Immunol.* 1997; 158(7):3277–84. PMID: 9120284.
15. Elkins K.L., Cowley S.C., Bosio C.M. Innate and adaptive immunity to *Francisella*. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2007; 1105:284–324. DOI: 10.1196/annals.1409.014.
16. Cowley S.C., Elkins K.L. Immunity to *Francisella*. *Front. Microbiol.* 2011; 2:26. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00026.
17. Elkins K.L., Kurtz S.L., De Pascalis R. Progress, challenges, and opportunities in *Francisella* vaccine development. *Expert Rev. Vaccines*. 2016; 15(9):1183–96. DOI: 10.1586/14760584.2016.1170601.
18. Beyersdorf N., Kerkau T., Hünig T. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *Immunotargets Ther.* 2015; 4:111–22. DOI: 10.2147/ITT.S61647.
19. Kartseva A.S., Silkina M.V., Kalmantaeva O.V., Mironova R.I., Firstova V.V., Pavlov V.M., Shemyakin I.G. [Comparison of early immune response of mice vaccinated with tularemia vaccine strain and its derivatives]. *Rossiiskiy Immunologicheskyy Zhurnal [Russian Immunological Journal]*. 2019; 22(3):1177–82.
20. Roberts L.M., Crane D.D., Wehrly T.D., Fletcher J.R., Jones B.D., Bosio C.M. Inclusion of epitopes that expand high-avidity CD4⁺ T cells transforms subprotective vaccines to efficacious immunogens against virulent *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* 2016; 197(7):2738–47. DOI: 10.4049/jimmunol.1600879.

Authors:

Kartseva A.S., Kalmantaeva O.V., Silkina M.V., Kombarova T.I., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Firstova V.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Об авторах:

Карцева А.С., Калмантаева О.В., Силкина М.В., Комбарова Т.И., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Фирстова В.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-70-82

УДК 616.98:578.2

Я.М. Краснов¹, А.Ю. Попова^{2,3}, В.А. Сафронов¹, А.В. Федоров¹, Д.В. Баданин¹, С.А. Щербакова¹,
В.В. Кутырев¹**АНАЛИЗ ГЕНОМНОГО РАЗНООБРАЗИЯ SARS-COV-2 И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ АДАПТАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ COVID-19 К ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ (СООБЩЕНИЕ 1)**¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;²Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация;³Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Российская Федерация

Цель – изучение эволюции генома вируса SARS-CoV-2 при адаптации к организму человека в период текущей пандемии. **Материалы и методы.** Использовалась база данных (GISAID) по нуклеотидным последовательностям геномов вируса SARS-CoV-2, полученных из образцов клинического материала в период с конца декабря 2019 по июль 2020 г. Построение филогенетических деревьев проводили с помощью программного обеспечения BioNumerics 7.6 с использованием алгоритма максимальной экономии (maximum parsimony). **Результаты и обсуждение.** Самым существенным устойчивым изменением в геномах вируса SARS-CoV-2 являются связанные единичные мутации в гене ORF1b (P314L) и гене S (D614G), в результате чего к настоящему времени подавляющее большинство выявляемых изолятов этого вируса имеет данную пару замен. Замена в гене S (D614G) многими исследователями ассоциируется со снижением патогенности содержащих ее штаммов, что, однако, может быть объяснено и улучшением методологии лечения больных в ходе пандемии. Влияние мутации в гене ORF1b (P314L) еще не изучено. Мутации P314L и D614G тесно связаны, и только их совместное присутствие в геноме дало преимущество для распространения данным геновариантам вируса SARS-CoV-2. Анализ обобщенных эпидемиологических данных свидетельствует о том, что распространение новых геновариантов вируса может быть связано с их биологическими свойствами, облегчающими передачу от человека к человеку, при этом ассоциированное снижение летальности может отражать не только прогресс в методах лечения, но и вероятное ослабление вирулентных свойств. Наблюдаемое увеличение потенциала распространения на фоне признаков снижения вирулентности, вероятно, является основной формой адаптации нового коронавируса к человеческой популяции и, по-видимому, будет продолжаться в дальнейшем в виде интеграции SARS-CoV-2 в структуру сезонных возбудителей ОРВИ.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, пандемия, передача от человека человеку, вирулентность, эволюция возбудителя.

Корреспондирующий автор: Краснов Ярослав Михайлович, e-mail: rusrapr@microbe.ru.

Для цитирования: Краснов Я.М., Попова А.Ю., Сафронов В.А., Федоров А.В., Баданин Д.В., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Анализ геномного разнообразия SARS-CoV-2 и эпидемиологических признаков адаптации возбудителя COVID-19 к человеческой популяции (Сообщение 1). Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 3:70–82 DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-70-82

Поступила 16.09.20. Отправлена на доработку 21.09.20. Принята к публ. 23.09.20.

Ya.M. Krasnov¹, A.Yu. Popova^{2,3}, V.A. Safronov¹, A.V. Fedorov¹, D.V. Badanin¹, S.A. Shcherbakova¹,
V.V. Kutyrrev¹**Genomic Diversity Analysis of SARS-CoV-2 and Epidemiological Features of Adaptation of COVID-19 Agent to Human Population (Communication 1)**¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;²Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation;³Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation

Abstract. Objective: to study the evolution of SARS-CoV-2 virus in the process of adapting to human organism during the current pandemic. **Materials and methods.** Database (GISAID) on nucleotide sequences of SARS-CoV-2 virus genome, obtained from clinical samples during the period of late December, 2019–July, 2020. Phylogenetic tree diagram construction was carried out applying BioNumerics v.7.6 software using Maximum parsimony algorithm. **Results and discussion.** The most substantial change in the genomes of SARS-CoV-2 virus are associated one-time mutations in ORF1b (P314L) and S (D614G) genes, as a result of which the overwhelming majority of identified isolates of this virus have the stated pair of substitutions to date. Many researches link the substitution in S (D614G) gene to the decreased pathogenicity in the strains that contain it, which may be also explained by enhanced methodology of patient treatment in the course of pandemic. The effect of the mutation in ORF1b (P314L) gene has not yet been investigated. P314L and D614G mutations are closely related and only their combined presence in the genome favored the dissemination of the genovariants of SARS-CoV-2 virus. Analysis of congregated epidemiological data testifies to the fact that the spread of new genovariants may be associated with biological properties facilitating human-to-human transmission. Thereat, associated decrease in lethality may reflect not only advancements in methods of treatment, but possible attenuation of virulent properties. Thus, observed growth in dissemination potential against the background of decrease in virulence is, probably, one of the forms of adaptation of new coronavirus to human population and, apparently, will remain in the future as the integration of SARS-CoV-2 virus into the structure of seasonal ARVI agents.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, pandemic, human-to-human transmission, virulence, evolution of the agent.

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

Corresponding author: Yaroslav M. Krasnov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Krasnov Ya.M., Popova A.Yu., Safronov V.A., Fedorov A.V., Badanin D.V., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Genomic Diversity Analysis of SARS-CoV-2 and Epidemiological Features of Adaptation of COVID-19 Agent to Human Population (Communication 1). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:70–82. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-70-82

Received 16.09.20. Revised 21.09.20. Accepted 23.09.20.

Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

Popova A.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-5307>

Safronov V.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9563-2833>

Shcherbakova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

Kutyrev V.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Коронавирусы вызывали эпидемические осложнения задолго до развивающейся в настоящее время пандемии COVID-19. В частности, бетакоронавирусы SARS-CoV и MERS-CoV являлись этиологическими агентами двух крупных вспышек SARS и MERS [1]. Новый бетакоронавирус SARS-CoV-2, вызывающий заболевание у человека – COVID-19, впервые зарегистрирован в декабре 2019 г. в городе Ухань (провинция Хубэй, центральный Китай) [2, 3]. Предполагается, что основными носителями в дикой природе вируса SARS-CoV-2 являются летучие мыши рода подковоносов [3, 4].

С момента первого обнаружения SARS-CoV-2 в декабре 2019 г. накопился значительный массив сведений об изменчивости генома и динамике распространения COVID-19 в странах мира. За период циркуляции в человеческой популяции геноварианты вируса подвергались фильтрации через иммунные системы каждого организма-хозяина, и при каждой передаче происходил некоторый отбор наиболее продуктивных и быстрее передающихся вариантов. На этот отбор влияет и противоэпидемическая деятельность человека, когда тщательно изолируются тяжелобольные, что способствует прекращению распространения наиболее патогенных вариантов. В отличие от упомянутых вспышек SARS и MERS, распространение COVID-19 не удастся взять под контроль за счет использования профилактических и противоэпидемических мероприятий, что делает наиболее вероятным интеграцию этого возбудителя в этиологическую структуру возбудителей ОРВИ в среднесрочной перспективе. В свою очередь внедрение SARS-CoV-2 в ряд возбудителей ОРВИ может сопровождаться снижением его вирулентных свойств по причине селективных преимуществ тех геновариантов, которые легче передаются от человека к человеку. В противовес этому, отрицательной селекции подвергаются штаммы возбудителя, способствующие развитию более тяжелого инфекционного процесса.

Наша работа направлена на анализ вариаций вируса SARS-CoV-2 и выявление эволюционных изменений его генома с учетом тенденций приобретения новых эпидемически значимых свойств.

Материалы и методы

Для проведения филогенетического анализа использовались данные, представленные на сай-

те организации GISAID (<https://www.gisaid.org>), по нуклеотидным последовательностям геномов вируса SARS-CoV-2, полученным из образцов клинического материала в период с конца декабря 2019 по июль 2020 г. По состоянию на 6 июля 2020 г. в этой базе содержалось 37952 полных последовательности геномов вируса SARS-CoV-2 с высокой степенью покрытия, полученных из всех регионов мира. Позже, 5 августа 2020 г., с сайта GISAID загружена еще 641 последовательность геномов вируса SARS-CoV-2, полученных из образцов клинического материала, взятого в июле 2020 г. В филогенетическом анализе нами использовались только нуклеотидные последовательности геномов вируса с высоким качеством прочтения. Для отбора последовательности геномов выравнивали (использовался сервис <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) по референсу – Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2). Затем последовательности выровненных геномов обрезали на 106 нуклеотидов от начала генома и на 390 нуклеотидов от его правого края по геному референсной последовательности. В случае наличия в оставшейся части последовательности генома хотя бы одного нераспознанного нуклеотида (N) этот геном удалялся из выборки для анализа. По описанным критериям отобрано 8360 нуклеотидных последовательностей геномов вируса SARS-CoV-2. Построение филогенетических деревьев проводили с помощью программного обеспечения BioNumerics 7.6 (<https://www.applied-maths.com>) с использованием алгоритма максимальной экономии (maximum parsimony). Для статистической обработки частоты встречаемости отдельных мутаций использовали всю базу данных полных геномов вируса SARS-CoV-2 на сайте GISAID (52468 геномов).

Для оценки эпидемиологических тенденций использованы данные о ежедневном числе регистрируемых случаев COVID-19 и летальных исходов в странах мира по данным университета Джонса Хопкинса на 13 июля 2020 г. по 188 странам за 173 дня наблюдений (<https://github.com/CSSEGISandData/COVID-19>).

Результаты и обсуждение

Полученная нами динамика эволюционной изменчивости генома вируса SARS-CoV-2 за период с конца декабря 2019 по июль 2020 г. (рис. 1–3) согласуется с данными, представленными в других работах [5, 6]. Подтверждено наличие ключевых мутаций

в геноме вируса SARS-CoV-2 в процессе его адаптации к организму человека при многократной передаче внутри человеческой популяции. Общее число мутаций, которые в совокупности имеют все секвенированные геномы вируса SARS-CoV-2, составляет

многие тысячи, однако редкие из них зафиксировались и стабильно наследуются. Мы определили только 22 единичные мутации, сохраняющиеся в $\geq 3\%$ от числа исследуемых геномов вируса SARS-CoV-2 (рис. 6, А). Для данного анализа использовали 52468

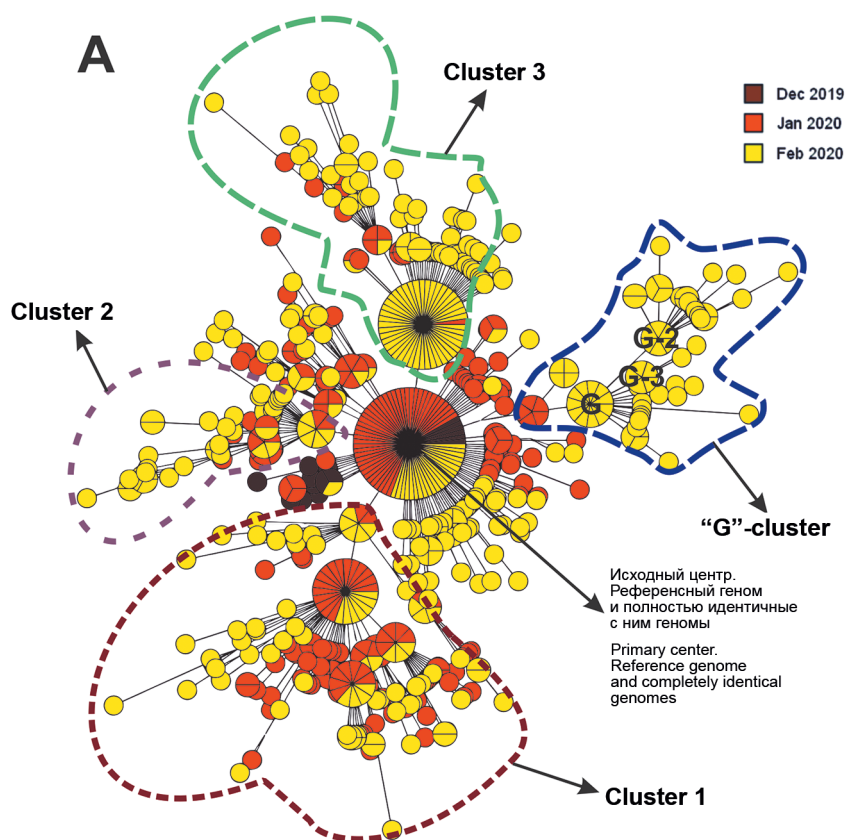
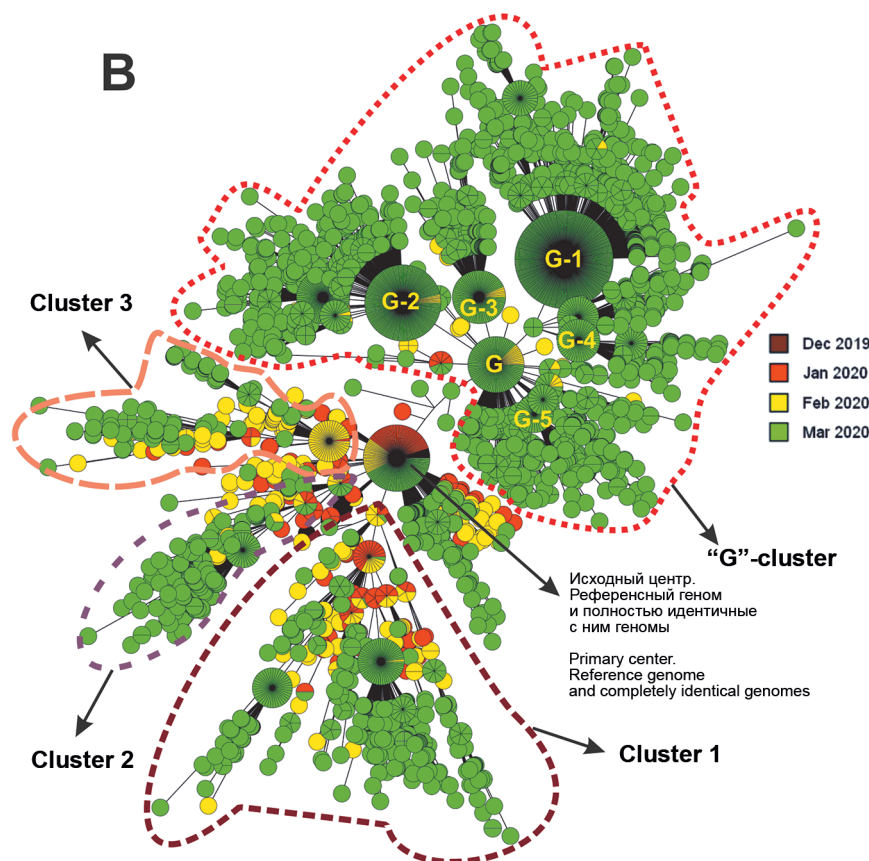


Рис. 1. Филогенетические связи геномов вируса SARS-CoV-2, полученных из клинического материала от пациентов из разных регионов мира (коричневый – декабрь, красный – январь, желтый – февраль, зеленый – март):

A – период с декабря 2019 по февраль 2020 г. *B* – период с декабря 2019 по март 2020 г. В течение марта наблюдается бурный рост числа геномов вируса SARS-CoV-2, имеющих мутации P314L (ORF1b ген) и D614G (S ген)

Fig. 1. Phylogenetic relations of SARS-CoV-2 virus genomes obtained from clinical material of patients from different regions of the world (brown color is for December, red color – January, yellow – February, green – March):

A – the period between December, 2019 and February, 2020. *B* – the period from December, 2019 to March, 2020. Throughout the March, an explosive growth in the number of genomes of SARS-CoV-2 virus that have P314L (ORF1b gene) and D614G (S gene) mutations is observed



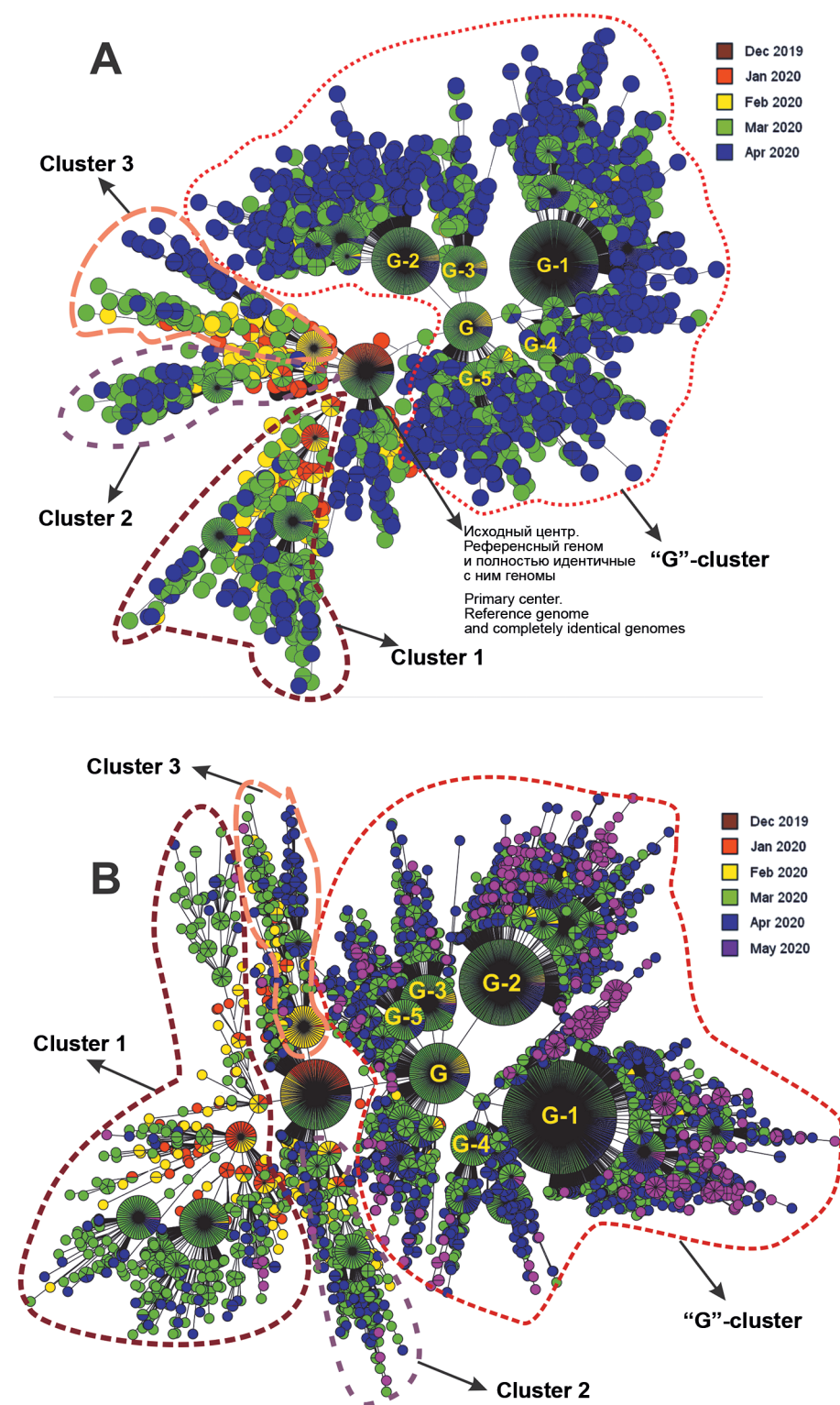


Рис. 2. Филогенетические связи геномов вируса SARS-CoV-2, полученных из клинического материала от пациентов из разных регионов мира:

A – в период с декабря 2019 по апрель 2020 г. (апрель выделен синим). *B* – в период с декабря 2019 по май 2020 г. (май выделен фиолетовым). Наблюдается дальнейший бурный рост числа геномов вируса, относящихся к «G»-кластеру. Число новых секвенированных геномов вируса SARS-CoV-2, не имеющих мутации P314L (ORF1b ген) и D614G (S ген), к маю 2020 г. не превышает 16 %, а к июню – 9 %

Fig. 2. Phylogenetic relations of SARS-CoV-2 virus genomes obtained from clinical material of patients from different regions of the world:

A – the period between December, 2019 and April, 2020 (April is marked with blue color). *B* – the period from December, 2019 to May, 2020 (May is colored violet). Further explosive growth in the number of genomes of SARS-CoV-2 virus appertaining to “G”-cluster is observed. The number of new sequenced genomes of SARS-CoV-2 virus without P314L (ORF1b gene) and D614G (S gene) mutations is less than 16 % towards May, while in June – only 9 %

полных геномов вируса, секвенированных из клинического материала, взятого с конца декабря 2019 по июль 2020 г. Стоит отметить, что все эти мутации зафиксированы с начала января по начало марта 2020 г., а позже в геноме вируса не фиксируется новых значительно представленных мутаций (рис. 6, B).

На ранних этапах развития пандемии COVID-19 (к середине января 2020 г.) в геноме вируса SARS-CoV-2 стабильно зафиксировались три основные группы мутаций, сформировавшие, соответствен-

но, три ветви эволюционного развития от одного исходного генома вируса (кластеры 1–3, рис. 1, A). Ключевые мутации, сформировавшие эти кластеры, следующие: кластер 1 (C8782T, T28144C); кластер 2 (G11083T, G26144T); кластер 3 (G1397A, G11083T, T28688C, или C6312A, G11083T, C13730T, C23929T, C28311T). Основное число мутаций, сформировавших три данных кластера, относится к гену ORF1ab, большинство из которых приводит к замене аминокислот (подчеркнутые позиции G1397A,

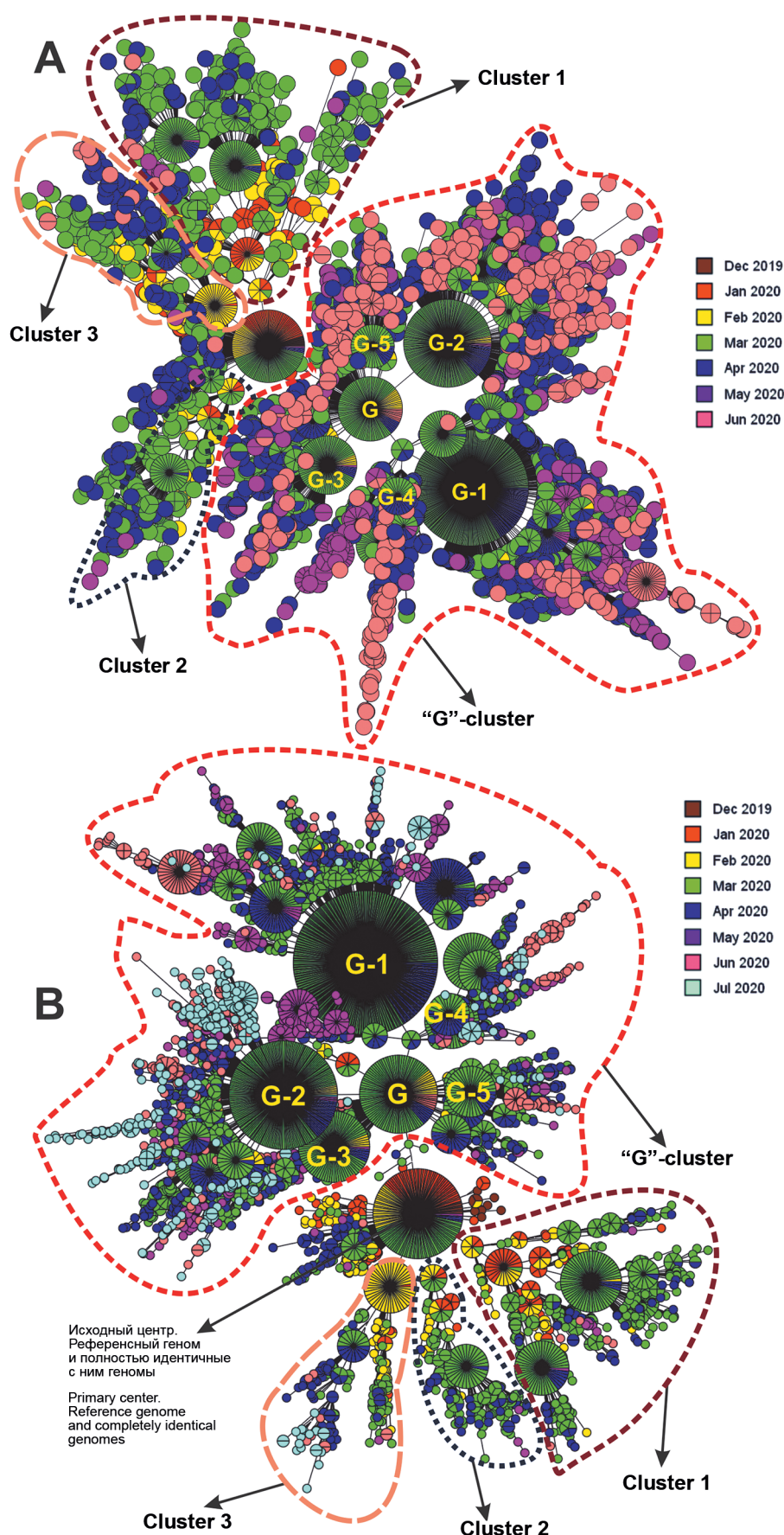


Рис. 3. Филогенетические связи геномов вируса SARS-CoV-2, полученных из клинического материала от пациентов из разных регионов мира:

A – в период с декабря 2019 по июнь 2020 г. (июнь выделен розовым). *B* – в период с декабря 2019 по июль 2020 г. (июль выделен голубым). Число новых секвенированных геномов вируса SARS-CoV-2, не входящих в «G»-кластер, к августу 2020 г. около 7 %

Fig. 3. Phylogenetic relations of SARS-CoV-2 virus genomes obtained from clinical material of patients from different regions of the world:

A – the period between December, 2019 and June, 2020 (June is marked with pink color). *B* – the period from December, 2019 to July, 2020 (July is colored light blue). The number of new sequenced genomes of SARS-CoV-2 virus, not included into «G»-cluster, amounts to 7 % by August

C6312A, и G11083T в кластерах 3 и 2). Три другие, не синонимичные мутации, относятся к генам: ORF8 (T28144C, кластер 1), ORF3a (G26144T, кластер 2)

и N (C28311T, кластер 3). Развитие эволюционных направлений данных трех кластеров замедляется к концу марта 2020 г., когда в основном начинают об-

наруживаться варианты штаммов вируса с мутацией в гене ORF1b (позиция P314L) и гене S (D614G).

Появление единичной мутации в гене ORF1b (P314L или C14408T) и гене S (D614G или A23403G) является самым существенным устойчивым изменением в геноме вируса SARS-CoV-2, в результате чего к настоящему времени подавляющее большинство (более 93 %) выявляемых изолятов этого вируса имеет данную пару замен. Замена в гене S (D614G) многими исследователями ассоциируется с повышением способности вируса к передаче и снижением его патогенности, последнее, однако, может быть объяснено и улучшением методологии лечения больных в ходе пандемии. Влияние мутации в гене ORF1b (P314L) еще не изучено. Появление и рост числа встречаемости данных мутаций в геномах вируса SARS-CoV-2, а также всеобщее распространение данных геновариантов вируса отмечено в ряде публикаций [5, 6, 13, 14]. Из анализа используемых нами данных установлено, что первые варианты вируса с этими двумя мутациями в геноме зафиксированы в клинических образцах от 24 января 2020 г. на территории Китая и позднее в Австралии, а в феврале уже в большинстве стран Западной Европы, а также в Саудовской Аравии, США, Канаде, Мексике, Бразилии, Марокко и Сенегале. Появление этих новых геновариантов вируса SARS-CoV-2 в дальнейшем привело к их стремительному распространению почти по всем странам мира (развитие «G»-кластера на рис. 1–3) и исчезновению предшествующих им, менее адаптированных к организму человека, вариантов вируса SARS-CoV-2 (кластеры 1–3 на рис. 1–3). Изначально от генома референсного штамма (Wuhan-Hu-1, NC_045512.2) новые геноварианты («G»-кластер) отличались 4 единичными мутациями: C241T, C3037T, C14408T, A23403G. Проведенный нами анализ показывает, что мутации C14408T и A23403G тесно связаны и только совместное их присутствие в геноме дало преимущество для распространения данным геновариантам вируса SARS-CoV-2, а наличие каждой из этих мутаций в отдельности (A23403G в отсутствие C14408T, или наоборот), независимо от сочетания других присутствующих единичных замен, не позволило получить распространение таким геновариантам вируса. Стремительное распространение новых геновариантов привело к тому, что геномы штаммов вируса SARS-CoV-2, не содержащие мутации C14408T и A23403G, уже к апрелю 2020 г. встречались только в 25 % случаев (кластер 1–3 на рис. 1, B). На территории России также наблюдается наличие вариантов штаммов вируса с данной парой мутаций в большинстве представленных геномов. Из 331 генома вируса SARS-CoV-2, секвенированного из клинического материала на территории России, 327 геномов (98,8 %) содержат данные мутации (рис. 4). Детальное сравнение геномов вируса SARS-CoV-2 на территории России и зарубежных стран подтверждает, что именно геноварианты вируса SARS-CoV-2, циркулирующие на территории Западной Европы, в

марте и апреле 2020 г. массово завезены в Россию. В Западной Европе к тому времени большинство геновариантов вируса SARS-CoV-2 уже имели мутацию C14408T (ген ORF1b) и A23403G (ген S).

Распространение по всему миру геновариантов вируса SARS-CoV-2, имеющих мутации D614G (ген S) и P314L (ген ORF1b), видимо, обусловлено ускоренным процессом их связывания с клеткой хозяина и проникновением в нее. На основе обобщения эпидемиологических данных видно, что распространение штаммов новых геновариантов вируса («G»-кластер) ассоциировано не только с ростом заболеваемости, но и со снижением летальности, как показано на рис. 5. Уже с марта 2020 г. наблюдается устойчивая тенденция к росту ежедневного числа регистрируемых больных на фоне распространения штаммов, относящихся к «G»-кластеру – с 16 % к началу марта до 97 % в конце июня, что косвенно подтверждает наличие более высокого потенциала передачи вируса от человека к человеку. При этом с середины апреля 2020 г. наблюдается динамическое снижение летальности с 10 до 2 %. Представленные данные дополнительно свидетельствуют в пользу того, что распространение штаммов вируса, относящихся к «G»-кластеру, может быть связано с его биологическими свойствами, облегчающими передачу

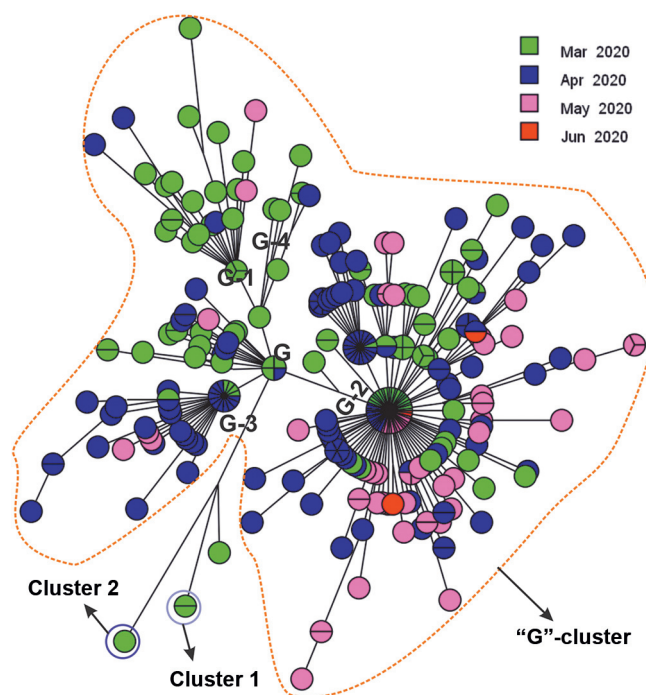


Рис. 4. Филогенетические связи 331 генома вируса SARS-CoV-2, полученного из клинического материала от пациентов на территории России в марте–июне 2020 г. Наиболее представлен подкластер G-2 (229 геномов) и подкластер G-3 (39 геномов), а также исходные варианты «G»-кластера (24 генома). Кластеры 1 и 2 представлены двумя и одним геномом вируса SARS-CoV-2 соответственно

Fig. 4. Phylogenetic relations of 331 genomes of SARS-CoV-2 virus obtained from clinical material of patients in the territory of Russia in March–June, 2020. The most represented sub-cluster is G-2 one (229 genomes), and G-3 sub-cluster (39 genomes), as well as initial variants of «G»-cluster (24 genomes). Clusters 1 and 2 are represented by two and one genome of SARS-CoV-2 virus, respectively

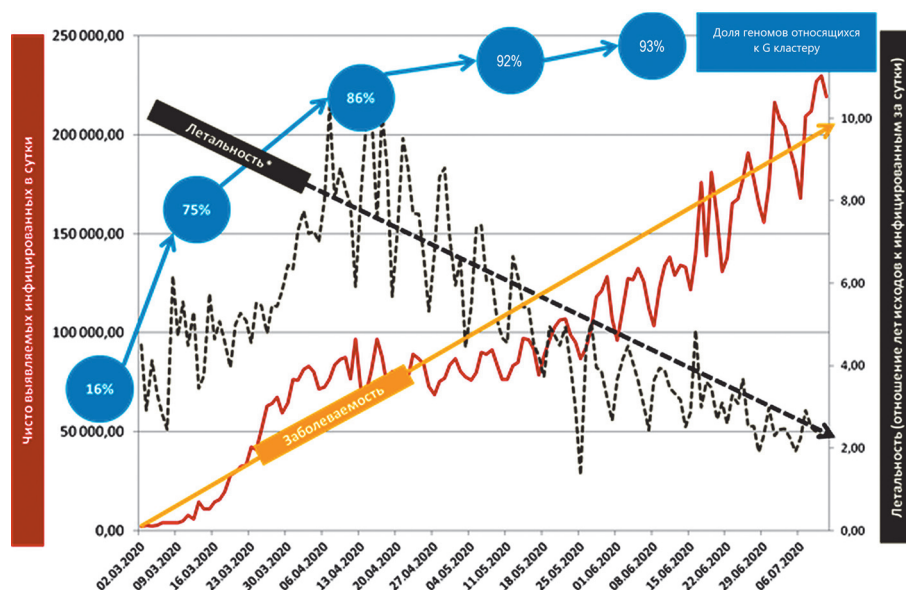


Рис. 5. Сводный график заболеваемости (красная линия), соотношение суточного числа летальных исходов и числа инфицированных (черная пунктирная линия, обозначенная как летальность) и распространенность геномов в «G»-кластере (светло-синяя линия)

Fig. 5. Summary graph of incidence (red line), the ratio of daily number of lethal cases and the number of infected persons (black dotted line, marked as lethality), and prevalence of genomes in "G"-cluster (light-blue line)

от человека к человеку, при этом ассоциированное снижение летальности может отражать не только прогресс в методах лечения, но и вероятное ослабление вирулентных свойств.

Формирование иммунной прослойки у населения против COVID-19 будет в основном зависеть от напряженности и длительности формируемого постинфекционного иммунитета, а также от эффективности разрабатываемых вакцин и порядка их применения. В описанных условиях SARS-CoV-2 будет встраиваться в этиологическую структуру возбудителей сезонных острых респираторных инфекционных болезней.

Скорость мутаций в геноме вируса SARS-CoV-2 на ранних этапах эпидемии (середина января 2020 г.) оценивалась в интервалах от $1,8 \cdot 10^{-4}$ до $4 \cdot 10^{-3}$ и от $5,2 \cdot 10^{-3}$ до $8,1 \cdot 10^{-3}$ на нуклеотид в год [7, 8]. В обеих статьях использовались небольшие количества полных геномов (33 и 54 соответственно). Позже в другом исследовании, где анализировалась выборка из 7666 геномов вируса SARS-CoV-2, результаты показали скорость его эволюции около $6 \cdot 10^{-4}$ на нуклеотид в год [9].

Для вируса SARS-CoV, послужившего причиной вспышки атипичной пневмонии в Китае в 2003 г., скорость мутации оценивалась от $0,8 \cdot 10^{-3}$ до $2,38 \cdot 10^{-3}$ на нуклеотид в год [10]. По-видимому, новый вариант вируса SARS-CoV-2 значительно уступает в скорости мутации близкородственному вирусу SARS-CoV.

Проведенный сравнительный анализ частоты мутаций на выборке из 8360 геномов показывает, что большинство вновь секвенированных геномов вируса SARS-CoV-2, включая варианты, полученные из клинического материала за июль 2020 г., до сих пор не отличаются от генома штамма референса (Wuhan-Hu-1, NC_045512.2) более чем на 10–12 единичных мутаций и редко имеют более 15 единичных мутаций. Исходя из полученных данных, можно утверждать, что однородность генома вируса SARS-CoV-2

в течение 7 мес. развития пандемии сохраняется на уровне $\geq 99,95\%$. На примере сделанной нами выборки установлено, что в совокупности анализируемые геномы содержат 5273 единичные мутации, отличающие их от исходного (референсного) штамма Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2). Однако в значительном количестве геномов вируса SARS-CoV-2 ($\geq 3\%$ от общего числа геномов) в исследуемой выборке сохраняются всего 22 единичные мутации. Остальные единичные мутации – уникальные или редко встречающиеся. После проведения аналогичного поиска значительно представленных мутаций среди всех доступных 52468 геномов вируса на сайте GISAID выявлено также 22 единичные мутации, присутствующие в $\geq 3\%$ от числа исследуемых геномов вируса SARS-CoV-2 (рис. 6, А), однако три из них были другими. Столбцами красного цвета на рис. 6, А обозначены несинонимичные единичные замены, столбцы синего цвета соответствуют синонимичным мутациям, серым цветом обозначена мутация за пределами открытой рамки считывания. Распределение отобранных 22 единичных мутаций по первой дате их обнаружения отображено на рис. 6, В. Все они зафиксированы в период с начала января по начало марта 2020 г. Позже, включая июль, в глобальном масштабе в геноме вируса нами не зафиксированы значительно представленные мутации. К тому же 4 единичные мутации (выделены серым цветом) перестали фиксироваться в геномах вируса SARS-CoV-2 с конца июня 2020 г. (рис. 6, В), три из них относятся к геновариантам из кластера 1 и одна мутация принадлежит кластеру 2 (рис. 1–3).

Вышеуказанные 22 единичные мутации располагаются в следующих генах: ORF1ab (12), S (2), ORF3a (2), ORF8 (1) и N (4), мутация в позиции C241T относится к некодирующей области. Остальные гены в большинстве геновариантов вируса остались без изменений (M, E, ORF6, ORF7ab и ORF10). Функциональные характеристики указанных выше генов, несущих закрепившиеся мутации,

можно разделить на две основные группы: гены, ответственные за синтез неструктурных белков вируса – ORF1ab, ORF3a и ORF8, и гены, синтезирующие соответствующие структурные белки вириона – S и N. Белок S образует гомотримерные шипы на поверхности вирусной частицы и опосредует вход вируса в клетку хозяина. Белок N связывает вирусную РНК и требуется для упаковки вирусной РНК в вирусную частицу во время ее сборки. В то же время белки М и Е не имеют закрепившихся мутаций, хотя являются важными в структуре вириона – белок М придает ему форму и имеет решающее значение вместе с белком Е в организации сборки вируса и формировании зрелых вирусных частиц [11, 12]. Таким образом, важные гены вируса SARS-CoV-2, необходимые для его взаимодействия с клеткой хозяина и связывания вирусной РНК, имеют мутации, закрепившиеся в процессе эволюционной адаптации к организму человека.

На рис. 1–3 представлены филогенетические связи между геномами вируса, распределенные по месяцам, каждый месяц маркирован определенным цветом. Исходя из филогенетических связей, представленных на рис. 1–3, видно, что геном вируса SARS-CoV-2 в январе 2020 г. уже имел ряд ключевых мутаций, которые в дальнейшем сформировали четыре основных кластера его геновариантов от одного исходного генома (геном штамма-референса и группа полностью идентичных ему геномов). Геномы вируса, составляющие «G»-кластер, содержат пару мутаций – D614G (ген S) и P314L (ген ORF1b), а в кластерах 1–3 данные мутации отсутствуют.

Ключевые мутации, сформировавшие три первых кластера (рис. 1–3), следующие: кластер 1 (C8782T, T28144C); кластер 2 (G11083T, G26144T); кластер 3 (G1397A/C6312A, G11083T, C28311T/T28688C). При этом единичные мутации, приводящие к замене аминокислот (подчеркнутая позиция), присутствуют в четырех генах: ORF1ab (G1397A, C6312A, G11083T – кластеры 2 и 3), ORF8 (T28144C – кластер 1), ORF3a (G26144T – кластер 2) и N (C28311T – кластер 3). Все эти гены, за исключением гена N (нуклеокапсид), кодируют аминокислотные последовательности неструктурных белков вируса [11, 12].

Первые геномы вируса, содержащие базовые мутации, формирующие кластер 1 (состоит из 797 геномов, рис. 3, В), секвенированы из клинического материала в 2020 г. на территории Китая (05.01.20), позднее они зафиксированы в США (19.01.20), Австралии (24.01.20), на Тайване (24.01.20), а также во Вьетнаме (24.01.20), Таиланде (25.01.20), Гонконге (27.01.20), Южной Корее (30.01.20) и Индии (31.01.20). В феврале данные по секвенированию геномов вируса, относящихся к кластеру 1, имелись только в Испании (28.02.20). Динамика развития кластера 1 в январе и феврале показана на рис. 1, А (кластер 1: красным цветом выделены геномы вируса, циркулирующие в январе, желтым – варианты генома за февраль). В марте штаммы

вируса из кластера 1 также зафиксированы в Чили (02.03.20), Мексике (03.03.20), Бразилии (05.03.20), Грузии (08.03.20), Нидерландах (09.03.20), Канаде (09.03.20), Шотландии (15.03.20), Омане (15.03.20), Люксембурге (17.03.20), Польше (18.03.20), Греции (18.03.20), Саудовской Аравии (23.03.20), Португалии (23.03.20), России (23.03.20), Казахстане (25.03.20) и Нигерии (29.03.20). Динамика развития кластера 1 в марте отображена на рис. 1, В (кластер 1: геномы выделены зеленым цветом). На изображении видно, что варианты штаммов вируса SARS-CoV-2 из кластера 1 к апрелю 2020 г. распространились по множеству стран, расположенных на всех континентах. Однако в апреле, мае, июне и июле распространение штаммов вируса из кластера 1 на новых территориях не зафиксировано. Частота их встречаемости убывает, как и количество стран, где они продолжают фиксироваться (рис. 2–3: геномы выделены синим, фиолетовым, розовым и голубым цветом). В мае штаммы вируса этих геновариантов зафиксированы в Индии, Шотландии, США и Казахстане, а в июне геномы вируса из кластера 1 фиксируются только в Индии (2 генома). Добавляются также новые страны, на территории которых обнаружены данные варианты вируса: Египет, Пакистан, Великобритания (представлено по 1 геному). В июле вирусы этих геновариантов не зафиксированы ни в одной из стран.

Первые геномы вируса SARS-CoV-2 в базе GISAID, содержащие базовые мутации, формирующие кластер 2 (состоит из 342 геномов, рис. 3, В), получены из клинического материала, взятого 17.01.2020 г. на территории Китая и Испании, США (21.01.20), Тайваня (23.01.20), Франции (23.01.20), Таиланда (23.01.20), Австралии (25.01.20), Сингапура (27.01.20), Италии (29.01.20) и Гонконга (30.01.20). В феврале зафиксировано распространение геновариантов вируса из этого кластера на территорию ряда других стран: Южная Корея (06.02.20), Швеция (07.02.20) и Испания (28.02.20). Динамика развития кластера 2 в январе и феврале показана на рис. 1, А. В марте геноварианты вируса из кластера 2 также зафиксированы в следующих странах: Норвегия (04.03.20), Нидерланды (06.03.20), Бельгия (07.03.20), Греция (07.03.20), Ямайка (09.03.20), Грузия (10.03.20), Португалия (11.03.20), Шотландия (12.03.20), Бразилия (18.03.20), Оман (18.03.20), Конго (20.03.20), Россия (24.03.20), Германия (28.03.20), Великобритания (29.03.20), Нигерия (29.03.20), Польша (31.03.20) и Шри-Ланка (31.03.20). Динамика развития кластера 2 в марте отображена на рис. 1, В (кластер 2: геномы выделены зеленым цветом). В итоге к апрелю 2020 г. вирус SARS-CoV-2 с вариантами генома из кластера 2 также распространился по всем континентам. Далее распространение штаммов вируса из кластера 2 на новых территориях не зафиксировано. Наблюдается уменьшение частоты их встречаемости и количества стран, в которых геноварианты из кластера 2 продолжают фиксироваться (рис. 2–3, кластер 2). Так,

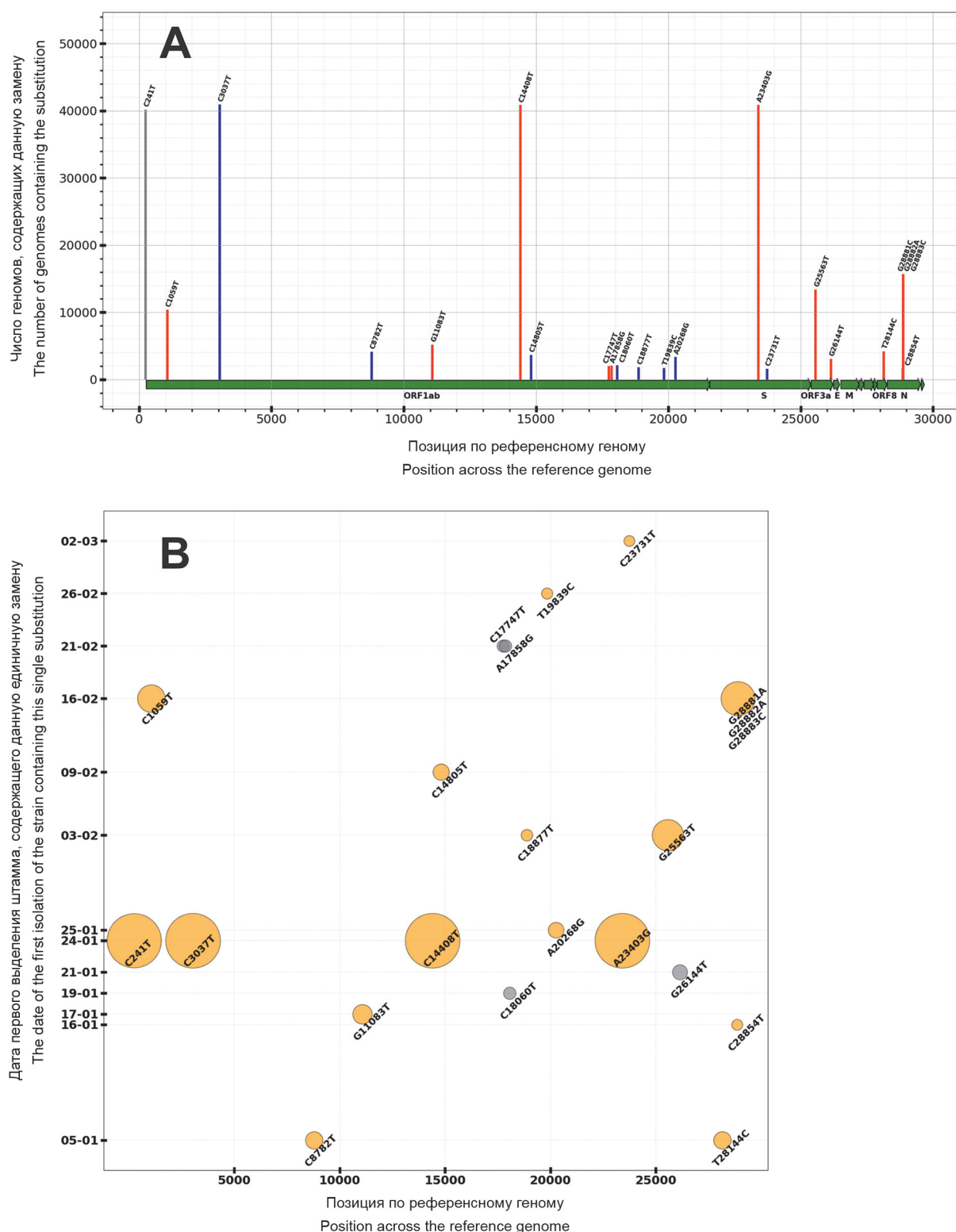


Рис. 6. Распределение единичных мутаций, стабильно сохраняющихся во многих геномах вирусов SARS-CoV-2:

A – распределение единичных мутаций, рассчитанное по выборке, включающей 52468 геномов вируса SARS-CoV-2 из базы данных на сайте GISAID (<https://www.gisaid.org>) с декабря 2019 по июль 2020 г. **B** – распределение 22 единичных мутаций, которые присутствуют более чем у 3 % от числа исследуемых геномов вируса SARS-CoV-2, по первой дате их обнаружения (число и месяц). Величина диаметра круга коррелирует с количеством геномов вируса SARS-CoV-2, содержащих соответствующую мутацию

Fig. 6. Distribution of single mutations, consistently retained in many genomes of SARS-CoV-2 virus:

A – distribution of single mutations, consistently retained in many genomes of SARS-CoV-2 virus calculated for the sample comprising 52 468 genomes of SARS-CoV-2 virus from the database available at GISAID (<https://www.gisaid.org>) dated December, 2019 – July, 2020. **B** – distribution of 22 single mutations which are found in more than 3 % of the investigated genomes of SARS-CoV-2 virus by the first date of their detection (date and month). The size of circle diameter correlates with the number of genomes of SARS-CoV-2 virus, containing the corresponding mutation

в мае они зарегистрированы только в Шотландии и Нидерландах, а в июне и июле уже отсутствуют данные секвенирования, подтверждающие их присутствие в какой-либо из стран.

Первые геномы вируса SARS-CoV-2, содержащие базовые мутации, формирующие кластер 3 (состоит из 349 геномов, рис. 3, В), получены из клинического материала, взятого в конце января на территории Китая (20.01.20), Гонконга (24.01.20) и Франции (29.01.20). В феврале зафиксировано распространение геновариантов вируса из этого кластера на территорию ряда других стран: Сингапур (01.02.20), Япония (круизный лайнер, 15.02.20), США (круизный лайнер, 18.02.20), Канада (20.02.20), Оман (23.02.20), Израиль (23.02.20), ОАЭ (25.02.20), Тайвань (25.02.20), Швеция (27.02.20) и Австралия (28.02.20). Динамика развития кластера 3 в январе и феврале показана на рис. 1, А. В марте геноварианты вируса из кластера 3 фиксируются на территории еще ряда новых стран: Германия (02.03.20), Кувейт (02.03.20), Нидерланды (03.03.20), Австралия (03.03.20), Пакистан (04.03.20), Саудовская Аравия (07.03.20), Индия (10.03.20), Бразилия (10.03.20), Малазия (16.03.20), Шри-Ланка (16.03.20), Турция (19.03.20), Бруней (21.03.20), Иран (26.03.20), Тунис (28.03.20), Словения (29.03.20), Индонезия (30.03.20), Уганда (30.03.20). Динамика развития кластера 3 в марте отображена на рис. 1, В (кластер 3: геномы выделены зеленым цветом). В апреле зафиксировано распространение геновариантов вируса из этого кластера на территорию Казахстана (26.04.20). В дальнейшем распространение штаммов вируса из кластера 3 на новых территориях не зафиксировано. Убывает частота их встречаемости и количество стран, в которых данные геноварианты фиксируются (рис. 2–3, кластер 3). В июне они зарегистрированы в Сингапуре, Индии и Австралии, а в июле продолжали фиксироваться только в Сингапуре.

Таким образом, в ходе анализа дат забора клинического материала и территорий, на которых зафиксированы геноварианты из трех вышеописанных кластеров, становится очевидным, что к апрелю 2020 г. варианты штаммов вируса SARS-CoV-2 из кластеров 1–3 распространились по большинству стран и регионов, расположенных на всех континентах. Однако уже к лету данные геноварианты встречаются редко. Нами проведен поиск геновариантов вируса, еще не имеющих мутации C14408T и A23403G (маркерные метки «G»-кластера), в доступной базе, представленной на сайте GISAID за июнь (3618 геномов) и июль (1260 геномов) по состоянию на 6 августа 2020 г. Результат поиска показал, что в клинических образцах за июнь геноварианты вируса, не имеющие данных мутаций, преобладают в Сингапуре и редко встречаются в США, Великобритании, Индии, Пакистане и Австралии. В клинических образцах за июль геноварианты вируса, не имеющие данных мутаций, по-прежнему преобладают в Сингапуре, один геновариант зафиксирован в Австралии.

Обобщая вышеизложенное, можно утверждать, что геноварианты вируса SARS-CoV-2 из кластеров 1–3 на сегодняшний день имеют слабое влияние на эпидемиологическую ситуацию. Число образцов клинического материала, содержащего такие геноварианты вируса, на территории абсолютного большинства стран составляет около 7 % и менее. Причиной этому послужило появление и широкое распространение геновариантов из «G»-кластера (рис. 1–3), более адаптированных к организму человека, которые конкурентно вытеснили первичные геноварианты, уже циркулирующие на территории всех континентов.

Первый геномом вируса SARS-CoV-2, содержащий мутации C14408T и A23403G, зафиксирован в Китае (Zhejiang_HZ103_2020_EPI_ISL_422425, получен из клинического материала от 24.01.2020 г.), а позднее в Австралии (Australia_NSW2153_2020_EPI_ISL_509505, клинический материал от 25.01.2020 г.). В первых числах февраля такие геноварианты зафиксированы в Великобритании и Саудовской Аравии. К концу февраля мутации C14408T и A23403G в геномах вируса уже зафиксированы на территории большинства стран Западной Европы, Северной и Южной Америки, а также Африки. Следует отметить, что мутации C14408T и A23403G тесно связаны и только их совместное присутствие в геноме дало преимущество для распространения данным геновариантам вируса SARS-CoV-2. Профиль нуклеотидных замен относительно референсного штамма (Wuhan-Hu-1, NC_045512.2) у исходных вариантов генома вируса, сформировавших «G»-кластер и получивших на сегодняшний день абсолютное большинство, был следующим: C241T, C3037T, C14408T, A23403G. Наличие в геноме вируса мутации A23403G в отсутствие C14408T имеют небольшое число геновариантов вируса и их количество уменьшается. Нами не найдены геноварианты вируса, имеющие в геноме только мутации C14408T и A23403G без C241T и C3037T, а также имеющие мутацию C14408T без мутации A23403G. Таким образом, только комплексное наличие мутаций (как минимум C14408T и A23403G) позволило геновариантам вируса получить преимущество в распространении среди человеческой популяции. Например, в базе данных GISAID среди геномов вируса, относящихся к маю, июню и июлю, нами найдено соответственно 51, 54 и 24 генома, имеющих мутации C241T, C3037T и A23403G, но не имеющих замену C14408T, что однозначно указывает на отсутствие преимуществ к распространению у данных геновариантов, несмотря на их циркуляцию во многих странах мира. Тем не менее в экспериментальной работе [15] представлены доказательства того, что геноварианты вируса с мутацией в S-белке (D614G) демонстрируют повышенную инфекционную активность (в 5 раз) в клетках, экспрессирующих ACE2, без участия мутации P314L в гене ORF1b при тестировании в псевдотипированных лентивирусных векторах. Этот результат, однако, не

согласуется с малым количеством геномов вируса, имеющих мутацию D614G и не имеющих мутацию P314L, чего не должно быть в случае нейтральности замены P314L.

В нуклеотидной последовательности генома вируса мутация A23403G находится в S-гене, в аминокислотной последовательности S-белка это привело к замене в позиции 614 аспарагиновой кислоты (D) на глицин (G). Белок, кодируемый S-геном, – гликопротеин (spike glycoprotein) – имеет функции распознавания клетки хозяина, связывания с ней и обеспечивает проникновение вируса в клетку [16]. Мутация C14408T в гене ORF1b привела к замене в позиции 314 пролина (P) на лейцин (L). Функция гена ORF1b связана с образованием ряда неструктурных белков, мутация P314L находится в структуре белка RdRp (nsp12), который непосредственно участвует в репликации вируса, и его точность влияет на вероятность появления мутаций в геноме вируса SARS-CoV-2 [13]. Данные замены оказались настолько важными (устойчивыми), что дальнейшая эволюция генома вируса, по всей вероятности, будет развиваться только на основе геновариантов вируса, содержащих эту пару замен. Появление и рост числа встречаемости данных мутаций уже отмечены в ряде публикаций [5, 6, 13, 14], а также представлены на сайте GISAID.

Помимо мутации D614G в S-гене и P314L в гене ORF1b, в феврале и начале марта 2020 г. появляется ряд других единичных замен в геноме вируса SARS-CoV-2, которые разделяют «G»-кластер на подкластеры (рис. 1–3). Профиль основных генетических мутаций в данном случае представлен следующими единичными мутациями: исходный «G»-кластер (C241T, C3037T, C14408T, A23403G); подкластер G-1 (C241T, C1059T, C3037T, C14408T, A23403G, G25563T), известный как GH-кластер; подкластер G-2 (C241T, C3037T, C14408T, A23403G, комплексная мутация трех нуклеотидов подряд – GGG28881-28883AAC), известный как GR-кластер; подкластер G-3 (C241T, C3037T, C14408T, A20268G, A23403G); подкластер G-4 (C241T, C2416T, C3037T, C18877T, C14408T, A23403G, G25563T, C26735T) и подкластер G-5 (C241T, C3037T, C14408T, C15324T, A23403G). Подкластер G-1 сформировался благодаря дополнительным мутациям в ORF1ab гене (C1059T) и гене ORF3a (G25563T); геномы вируса из подкластера G-2, помимо исходного профиля мутаций «G»-кластера, имеют комплексную мутацию трех нуклеотидов подряд в последовательности гена N – GGG28881-28883AAC. Подкластеры G-3 (A20268G, ген ORF1ab), G-4 (C2416T, C18877T, ген ORF1ab; G25563T, ген ORF3a; C26735T, ген M) и G-5 (C15324T, ген ORF1ab) формируются за счет дополнительных синонимичных и несинонимичных мутаций, указанных в скобках. Как можно заметить, кроме базовых мутаций C241T, C3037T, C14408T и A23403G, геномы вируса из «G»-кластера имеют на сегодняшний день ряд других закрепившихся мута-

ций, отличных от геномов вируса из кластеров 1–3.

Частота встречаемости вариантов вируса SARS-CoV-2 с геномами, образующими «G»-кластер, в образцах клинического материала составляет на сегодняшний день для большинства регионов мира в среднем около 93 % (рис. 3, B).

По данным секвенирования, в конце февраля и первых числах марта в «G»-кластере появляются пять основных быстро развивающихся ответвлений (подкластеров): G-1, G-2, G-3, G-4 и G-5, – маркерные мутации которых описаны выше. Первые геноварианты из подкластера G-1 сначала фиксируются на территории Сингапура (16.02.20), Франции (21.02.20), Сенегала (28.02.20), Бельгии (29.02.20) и США (29.02.20). В марте данные геноварианты фиксируются также в Канаде, Швеции, Нидерландах, Норвегии и России. В итоге геноварианты из подкластера G-1 (1908 геномов, рис. 3, B) становятся наиболее характерными для территории Северной Америки.

Первые геноварианты из подкластера G-2 фиксируются в Великобритании (16.02.20) и позднее в Италии (24.02.20), Австрии (24.02.20), Германии (25.02.20), Дании (26.02.20), Швейцарии (27.02.20), Мексике (27.02.20), Шотландии (28.02.20), США (28.02.20) и Испании (29.02.20). В итоге геноварианты из подкластера G-2 (1861 геном, рис. 3, B) становятся наиболее характерными для территории Западной Европы.

Первые геноварианты из подкластера G-3 фиксируются в Великобритании (24.02.20), Италии (26.02.20), Швейцарии (27.02.20) и США (28.02.20). В итоге геноварианты из подкластера G-3 (369 геномов, рис. 3, B) становятся типичными для территории Западной Европы.

Первые геноварианты из подкластера G-4 фиксируются в Саудовской Аравии (03.02.20), затем в Канаде (27.02.20), США (28.02.20) и Франции (29.02.20). В итоге геноварианты из подкластера G-4 (676 геномов, рис. 3, B) встречаются как на территории Северной Америки, так и Западной Европы.

Геноварианты из подкластера G-5 сначала зафиксированы на территории Китая (01.02.20), а в конце февраля – в Германии и Объединенных Арабских Эмиратах. В марте они фиксируются в Швейцарии, Бельгии и Франции. В итоге геноварианты из подкластера G-5 (261 геном, рис. 3, B) встречаются на территории Западной Европы, редко в Северной Америке и Индии.

На территорию России вирус SARS-CoV-2 завезен массово в марте и начале апреля 2020 г. гражданами, прибывшими из-за рубежа. На рис. 4 представлено филогенетическое дерево из 331 генома вируса SARS-CoV-2, полученного на территории России. Только 4 генома (1,2 %) вируса SARS-CoV-2 из данной выборки не относятся к «G»-кластеру. Филогенетический анализ показал, что основное количество геномов (81 %) вируса SARS-CoV-2, циркулирующего на территории России, относится

к подкластерам G-2 и G-3 (229 и 39 геномов соответственно). Варианты данных геномов вируса SARS-CoV-2 типичны для территории Западной Европы уже с конца февраля 2020 г. Близкие им варианты генома только в небольших количествах секвенированы из клинического материала от пациентов из Северной и Южной Америки, Саудовской Аравии и Индии. Таким образом, почти все генетическое разнообразие вариантов генома вируса SARS-CoV-2, распространенных на территории России, относится к «G»-кластеру и в пределах этого кластера разделяется на 5 групп: G, G-1, G-2, G-3 и G-4.

Полученные нами данные подтверждают, что основным регионом, из которого осуществлен завоз штаммов вируса SARS-CoV-2 на территорию России, является Западная Европа. В это время в Западной Европе в большинстве секвенированных клинических образцов уже содержались геноварианты вируса из «G»-кластера [13].

На сегодняшний день мы наблюдаем повсеместное распространение геновариантов вируса SARS-CoV-2, имеющих мутацию D614G (ген S) и P314L (ген ORF1b), в отличие от геновариантов вируса SARS-CoV-2, не имеющих данных мутаций, что, видимо, обусловлено ускоренным процессом связывания вируса с клеткой хозяина и проникновением в нее. Характерно, что указанный тренд наблюдается как в мире в целом, так и, при независимом анализе, в разрезе отдельных регионов, что подтверждает наличие эволюционного преимущества новых геновариантов. В литературе описано две гипотезы, объясняющие, как мутация D614G связана с повышенной передачей вируса SARS-CoV-2. Первая гипотеза основана на структурном положении мутации D614G [14, 17] и связана с уменьшением взаимодействия между субъединицами S1 и S2 в S-белке, которое способствует их облегченному расщеплению и, соответственно, дальнейшему слиянию вируса со стенкой клетки хозяина и последующему проникновению в клетку. Вторая гипотеза состоит в том, что эта мутация может косвенно усилить взаимодействие рецептор-связывающего домена на поверхности субъединицы S1 белка S вируса с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (связь RBD-ACE2), что также способствует ускоренному взаимодействию частицы вируса с клеткой [17, 18].

Следует отметить, что распространение штаммов «G»-кластера ассоциировано не только с ростом заболеваемости (до 200 и более тысяч ежедневно выявляемых инфицированных), но и со снижением летальности, как показано на рис. 5. Уже с марта 2020 г. наблюдается устойчивая тенденция к росту ежедневного числа регистрируемых больных на фоне распространения штаммов, относящихся к «G»-кластеру – с 16 % к началу марта до 93 % в конце июня, что косвенно подтверждает наличие более высокого потенциала у данных геновариантов вируса к передаче от человека к человеку. При этом с середины апреля 2020 г. наблюдается динамиче-

ское снижение летальности с 10 до 2 % (оцененной в данном исследовании как отношение суточного числа летальных исходов к суточному числу зарегистрированных больных в процентном выражении). Представленные данные дополнительно свидетельствуют в пользу того, что распространение штаммов вируса, относящихся к «G»-кластеру, может быть связано с его биологическими свойствами, облегчающими передачу от человека к человеку, при этом ассоциированное снижение летальности может отражать не только прогресс в методах лечения, но и вероятное ослабление вирулентных свойств.

Таким образом, одним из актуальных вопросов оценки глобального риска, связанного с пандемией COVID-19, остается интерпретация наблюдаемых изменений в геноме, что имеет значение для долгосрочного прогноза развития эпидемического процесса. До тех пор, пока отсутствует общедоступная и эффективная вакцина, развитие эпидемического процесса обуславливается, с одной стороны, биологическими свойствами возбудителя, а с другой – комплексом неспецифических профилактических и противоэпидемических мероприятий. При сохранении текущих темпов распространения COVID-19 формирование иммунной прослойки будет в основном зависеть от напряженности и длительности формируемого постинфекционного иммунитета, а также от эффективности разрабатываемых вакцин и порядка их применения. В описанных условиях SARS-CoV-2 будет встраиваться в этиологическую структуру возбудителей сезонных острых респираторных инфекционных болезней.

Следует подчеркнуть, что эволюция SARS-CoV-2 продолжается и требует непрерывной научной оценки с использованием передовых методов анализа генетических последовательностей. При этом представленные данные свидетельствуют о том, что распространение штаммов вируса из «G»-кластера может быть связано с их биологическими свойствами, облегчающими передачу от человека к человеку, в то время как снижение летальности может отражать ослабление вирулентных свойств. Отдельного внимания заслуживает изучение биологических свойств геновариантов SARS-CoV-2.

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

Благодарность. Авторский коллектив выражает глубокую признательность члену-корреспонденту РАН, доктору биологических наук Нетёсову Сергею Викторовичу, за объективные комментарии, сделанные по содержанию статьи, учет которых позволил сделать работу существенно сильнее и убедительнее.

References / Список литературы

1. Cui J., Li F., Shi Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019; 17(3):181–92. DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9.
2. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.-M., Wang W., Song Z.-G., Hu Y., Tao Z.-W., Tian J.-H., Pei Y.-Y., Yuan M.-L., Zhang Y.-L., Dai F.-H., Liu Y., Wang Q.-M., Zheng J.-J., Xu L., Holmes E.C., Zhang

- Y.-Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579(7798):265–9. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.
3. Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.-R., Zhu Y., Li B., Huang C.-L., Chen H.-D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.-D., Liu M.-Q., Chen Y., Shen X.-R., Wang X., Zheng X.-S., Zhao K., Chen Q.-J., Deng F., Liu L.-L., Yan B., Zhan F.-X., Wang Y.-Y., Xiao G.-F., Shi Z.-L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798):270–3. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.
4. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D.Y., Xu W., Holmes E.C., Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020; 395(10224):565–74. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
5. Kupferschmidt K. The pandemic virus is slowly mutating. But does it matter? *Science*. 2020; 369(6501):238–9. DOI: 10.1126/science.369.6501.238.
6. Bhattacharyya Ch., Das Ch., Ghosh A., Singh A.K., Mukherjee S., Majumder P.P., Basu A., Biswas N.K. Global spread of SARS-CoV-2 subtype with spike protein mutation D614G is shaped by human genomic variations that regulate expression of *TMPRSS2* and *MX1* genes. bioRxiv. 2020.05.04.075911. DOI: 10.1101/2020.05.04.075911.
7. Li X., Wang W., Zhao X., Zai J., Zhao Q., Li Y., Chaillon A. Transmission dynamics and evolutionary history of 2019-nCoV. *J. Med. Virol.* 2020; 92(5):501–11. DOI:10.1002/jmv.25701.
8. Benvenuto D., Giovanetti M., Salemi M., Prosperi M., De Flora C., Alcantara L.C.J., Angeletti S., Ciccozzi M. The global spread of 2019-nCoV: a molecular evolutionary analysis. *Pathog. Glob. Health*. 2020; 114(2):64–7. DOI: 10.1080/20477724.2020.1725339.
9. Van Dorp L., Acman M., Richard D., Shaw L.P., Ford C.E., Ormond L., Owena C.J., Pang J., Tan C.C.S., Boshier F.A.T., Ortiz A.T., Balloux F. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 83:104351. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104351.
10. Zhao Z., Li H., Wu X., Zhong Y., Zhang K., Zhang Ya-P., Boerwinkle E., Fu Y.-X. Moderate mutation rate in the SARS coronavirus genome and its implications. *BMC Evol. Biol.* 2004; 4:21. DOI: 10.1186/1471-2148-4-21.
11. Mousavizadeh L., Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.03.022.
12. Ashour H.M., Elkhatab W.F., Rahman Md.M., Elshabrawy H.A. Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks. *Pathogens*. 2020; 9(3):186. DOI: 10.3390/pathogens9030186.
13. Pachetti M., Marini B., Benedetti F., Giudici F., Mauro E., Storici P., Masciovecchio C., Angeletti S., Ciccozzi M., Gallo R.C., Zella D., Ippodrino R. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J. Transl. Med.* 2020; 18:179. DOI: 10.1186/s12967-020-02344-6.
14. Korber B., Fischer W.M., Gnanakaran S., Yoon H., Theiler J., Abfalterer W., Foley B., Giorgi E.E., Bhattacharya T., Parker M.D., Partridge D.G., Evans C.M., de Silva T.I., LaBranche C.C., Montefiori D.C. Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2. bioRxiv. DOI: 10.1101/2020.04.29.069054.
15. Ogawa J., Zhu W., Tonnu N., Singer O., Hunter T., Ryan (Firth) A.L., Pao G.M. The D614G mutation in the SARS-CoV2 Spike protein increases infectivity in an ACE2 receptor dependent manner. bioRxiv. DOI: 10.1101/2020.07.21.214932.
16. Chen W.H., Hotez P.J., Bottazzi M.E. Potential for developing a SARS-CoV receptor-binding domain (RBD) recombinant protein as a heterologous human vaccine against coronavirus infectious disease (COVID)-19. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020; 16(6):1239–42. DOI: 10.1080/21645515.2020.1740560.
17. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.-L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020; 367(6483):1260–3. DOI: 10.1126/science.abb2507.
18. Walls A.C., Park Y.-J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020; 181(2):281–292.e6. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.

Authors:

Krasnov Ya.M., Safronov V.A., Fedorov A.V., Badanin D.V., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Popova A.Yu. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare; 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation. Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation.

Об авторах:

Краснов Я.М., Сафронов В.А., Федоров А.В., Баданин Д.В., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Попова А.Ю. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7. Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования; Российская Федерация, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-83-88

УДК 616.98:579.841.93

С.А. Курчева, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Ю.В. Сирица, М.В. Костюченко, А.Г. Кошкидько, И.В. Жарникова, Е.Л. Ракитина, О.В. Логвиненко, А.М. Жиров

КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ БРУЦЕЛЛЕЗНЫХ АНТИГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТОВ *IN VITRO*

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Для разработки наиболее диагностически информативных методик постановки антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* необходим тщательный подбор стимулирующего агента (антигена), обладающего достаточным активирующим потенциалом и обеспечивающим специфичность реакции. **Цель работы** – определение качественных показателей экспериментальных серий бруцеллезных антигенных препаратов, предназначенных для клеточных тестов *in vitro*. **Материалы и методы.** Для проведения исследований получали антигенные комплексы бруцеллезного микроба – на основе вакцинных штаммов трех эпидемически значимых видов *Brucella* spp. (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*). Количественное определение белков экспериментальных серий полученных препаратов *WsAg* и *PPBC* проводили методом специфической флуориметрии. Исследование белкового состава препаратов проводили методом капиллярного электрофореза. Качественный состав определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии с рефрактометрической детекцией. **Результаты и обсуждение.** В результате исследований определены физико-химические характеристики, изучены хроматографические профили и состав белковых фракций, а также проведена апробация изготовленных экспериментальных серий бруцеллезных антигенных препаратов. Анализируя охарактеризованный белковый и полисахаридный состав полученных образцов *WsAg*, можно сделать заключение о невозможности использования препарата *WsAg* для клеточных тестов, так как экспериментально доказана вероятность проявления неспецифических реакций лимфоцитов *in vitro*. В свою очередь, комплексный бруцеллезный антигенный препарат *PPBC* обладает выраженной специфической активностью и специфичностью в условиях *in vitro* и имеет перспективы использования при разработке методических подходов для лабораторной диагностики бруцеллеза и оценке фактической привитости контингентов риска после вакцинации. Полученные характеристики позволяют обеспечить надлежащее качество при производстве разработанного экспериментального препарата *PPBC*, предназначенного для клеточных тестов *in vitro*, с учетом современных правил валидации и стандартизации.

Ключевые слова: бруцеллез, *Brucella* spp., антигенспецифические клеточные тесты *in vitro*, антигенный комплекс.

Корреспондирующий автор: Курчева Светлана Александровна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Курчева С.А., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Сирица Ю.В., Костюченко М.В., Кошкидько А.Г., Жарникова И.В., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Жиров А.М. Качественные показатели экспериментальных бруцеллезных антигенных препаратов, предназначенных для клеточных тестов *in vitro*. Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 3:83–88. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-83-88

Поступила 11.11.19. Отправлена на доработку 15.01.20. Принята к публ. 04.09.20.

S.A. Kurcheva, D.A. Kovalev, D.G. Ponomarenko, Yu.V. Siritsa, M.V. Kostyuchenko, A.G. Koshkid'ko, I.V. Zharnikova, E.L. Rakitina, O.V. Logvinenko, A.M. Zhirov

Qualitative Indicators of Experimental Brucellosis Antigen Preparations Designed for Cellular Tests *in vitro*

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. In order to develop the most diagnostically informative methods for carrying out antigen-stimulated cellular tests *in vitro* a careful selection of stimulating agent (antigen) is required, possessing an adequate activating potential and providing specificity of the reaction. **Objective** of the study was to identify the qualitative indicators of experimental batches of brucellosis antigen preparations designed for cellular tests *in vitro*. **Materials and methods.** Initially we produced antigen complexes of brucellosis microbe on the basis of the vaccine strains of three epidemically significant *Brucella* species (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*). Quantitative determination of *WsAg* and *PPBC* proteins of experimental preparation series was performed applying capillary electrophoresis. Qualitative composition was assessed through ion exchange liquid chromatography with refractometric detection. **Results and discussion.** We have specified physical-chemical features, investigated chromatographic profiles and composition of protein fractions, as well as tried the produced experimental batches of brucellosis antigen preparations. After analyzing the defined protein and polysaccharide composition of the obtained *WsAg* samples, one can conclude that *WsAg* preparation cannot be used for cellular tests as the probability of non-specific lymphocyte reaction manifestation *in vitro* was experimentally proven. By contrast, complex brucellosis antigen preparation *PPBC* has an expressed specific activity and specificity under *in vitro* conditions and the prospects to be used when developing methodological approaches for laboratory diagnosis of brucellosis and assessment of *de facto* immunity rate in risk contingents after vaccination. The obtained parameters will allow for proper quality provision when manufacturing the developed experimental *PPBC* preparation designed for cellular tests *in vitro*, taking into account modern validation and standardization regulations.

Key words: brucellosis, *Brucella* spp., antigen-specific cellular tests *in vitro*, antigen complex.

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

Corresponding author: Svetlana A. Kurcheva, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Citation: Kurcheva S.A., Kovalev D.A., Ponomarenko D.G., Siritsa Yu.V., Kostyuchenko M.V., Koshkid'ko A.G., Zharnikova I.V., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Zhiron A.M. Qualitative Indicators of Experimental Brucellosis Antigen Preparations Designed for Cellular Tests *in vitro*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:83–88. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-83-88

Received 11.11.19. *Revised* 15.01.20. *Accepted* 04.09.20.

Kurcheva S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3564-0791>
Kovalev D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>
Ponomarenko D.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0422-6755>
Siritsa Yu.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9442-6966>
Kostyuchenko M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6068-6655>
Koshkid'ko A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6617-9504>
Zharnikova I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8443-4089>
Rakitina E.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6073-6544>
Logvinenko O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1054-8937>
Zhiron A.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

Этиопатогенетическая особенность бруцеллеза обуславливается способностью возбудителя инфекции «уклоняться» от иммунного ответа хозяина (выживать и размножаться как в фагоцитарных, так и в нефагоцитарных клетках), что приводит к хроническому течению заболевания с длительной персистенцией патогена [1–3]. Вакцинация населения против бруцеллеза входит в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Для иммунизации людей применяется живая вакцина, приготовленная из вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA, при ее введении у людей возникает бессимптомная или латентная инфекция в сочетании с формированием нестерильного иммунитета, переходящего в постинфекционный, стерильный [4–6].

Для оценки специфического клеточно-опосредованного иммунитета против возбудителя бруцеллеза предложена кожная алергологическая реакция с бруцеллином (проба Бюрне), но в настоящее время она применяется крайне редко в связи с высоким риском развития общих и местных побочных реакций.

В последние годы в лабораторную практику активно внедряются диагностические тесты, основанные на антигенспецифических клеточных реакциях *in vitro*, позволяющие выявить интенсивность экспрессии иммунокомпетентными клетками различных рецепторов активации при оценке формирования и напряженности клеточного иммунитета [7–13].

Для разработки диагностически информативных методик постановки антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* необходим тщательный подбор стимулирующего агента (антигена), обладающего достаточным активирующим потенциалом и обеспечивающего специфичность реакции в условиях *in vitro* [14, 15]. В настоящее время на фармацевтическом рынке отсутствует коммерчески доступный препарат, отвечающий необходимым для постановки реакции требованиям. На базе Ставропольского противочумного института получены несколько экспериментальных серий препаратов, содержащих различные по составу антигенные комплексы.

Цель настоящей работы – определить качественные показатели экспериментальных серий бруцеллезных антигенных препаратов *WsAg* и *PPBC* и оценить возможную перспективу их использования в антигенспецифических клеточных тестах *in vitro*.

Материалы и методы

Антигенные комплексы бруцеллезного микроба получали на основе вакцинных штаммов трех эпидемически значимых видов *Brucella spp.* (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) из коллекции патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института. Работы с культурами штаммов проводили с соблюдением СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Метод получения бруцеллезного антигенного комплекса *WsAg* предложен Е.Н. Афанасьевым и соавт. в 1986 г., технология включает в себя водно-солевую и ультразвуковую дезинтеграцию с осаждением белковых фракций сульфатом аммония, что позволяет получить активный специфический препарат, который имеет длительную историю успешного применения как специфический агент для сенсibilизации биологических объектов и/или твердой фазы в иммуноферментных тест-системах. Бруцеллезный антигенный комплекс *PPBC* получен по модифицированной нами методике получения вышеуказанного антигенного комплекса.

Для проведения исследований изготовили пять экспериментальных серий каждого препарата. Полученные серии разливали в ампулы по 0,5 мл, замораживали и подвергали сублимационному высушиванию на лиофильной установке *Martin Christ* (Германия) с последующей герметизацией и маркировкой ампул с полученным продуктом. Для осуществления межлабораторных испытаний комиссионно отбирали по три образца каждой серии. За один образец принимали содержимое одной ампулы.

Для проведения исследований применяли реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США): дансилгидразин, трифторуксусную кислоту > 99 %, ацетонитрил > 99,93 %, ацетат аммония > 98 %, фосфатно-солевой буфер (рН 7,4), D-глюкозу, N-ацетил-D-галактозамин, рибозу, сахарозу, лактозу, ксилозу, галактозу, рамнозу, арабинозу, фруктозу.

Спектры поглощения исследуемых образцов в диапазоне 180–800 нм получены на спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США).

Количественное определение белков проводили методом специфической флуориметрии на приборе

Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, США) с использованием набора реактивов Qubit Protein Assay Kit (Invitrogen, США).

Исследование белкового состава препаратов проводили методом капиллярного электрофореза на чипе для анализа белков (набор Experion Pro260 Analysis Kit для 10 чипов, Bio-Rad) с помощью автоматической системы Experion System (Bio-Rad, США). Обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Experion Software, Version 3.2.

Качественный состав определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии с рефрактометрической детекцией. Оборудование ВЭЖХ: система жидкостной хроматографии Konik Q12 C (Konik, Испания), колонка хроматографическая ZORBAX NH2 4,6×250 mm (Agilent Technologies, США) с предколонкой 1×0,4 cm; детекция – рефрактометрический детектор (Konik RID 560). Условия ВЭЖХ: подвижная фаза – ацетонитрил/Н₂O (70/30); скорость подвижной фазы 1,8 мл/мин; в изократическом режиме в течение 15 мин, температура термостата колонки 30 °С; объем вводимой пробы 20 мкл. Для вычисления времени удерживания, площадей хроматографических пиков при детектировании, а также для графического представления хроматограмм использовали программу Konikrom Plus (Konik, Испания).

Исследовали интактные водные растворы *WsAg* и *PPBC* (концентрация 1 мг/мл) и кислотные гидролизаты образцов. Гидролиз проводили 2М трифторуксусной кислотой при температуре 99 °С с последующим испарением кислоты при пониженном давлении и температуре 30 °С.

Хроматографический анализ гидролизированных образцов бруцеллезных антигенных комплексов осуществляли путем сравнения со стандартами моно- и дисахаридов, проводя не менее пяти измерений для каждой пробы. Идентификацию компонентов на хроматограммах исследуемых гидролизатов осуществляли путем сравнения со временем удерживания стандартных образцов моно- и дисахаридов (D-глюкоза, галактозамин, сахароза, лактоза, ксилоза, галактоза, рамноза, арабиноза, фруктоза). Воспроизводимость хроматограмм разных серий составила (98,0±0,5) %, что свидетельствует о стандартности технологического процесса и получаемых продуктов.

Для определения специфической активности изготовленных экспериментальных серий препаратов использовали метод двойной иммунодиффузии (РИД) в 1 % агаровом геле (Difko, США) по О. Ouchterlony в чашках Петри с применением гипериммунной сыворотки против возбудителя бруцеллеза производства Ставропольского противочумного института с предварительно проверенной активностью в РИД не менее 1:16. При контроле специфичности использовали сыворотки производства Иркутского научно-исследовательского противочумного института (сыворотка диагностическая туляремиальная сухая для реакции агглютинации, сыворотка диагностическая

холерная О1 адсорбированная сухая для реакции агглютинации) и сыворотку диагностическую сальмонеллезную О-поливалентную редких групп производства ООО НПО «ЭКОлаб-Диагностика».

Все эксперименты с животными выполнялись в соответствии с законодательством Российской Федерации и Директивой европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

Специфическую активность и специфичность полученных бруцеллезных антигенных комплексов оценивали в клеточных тестах *in vitro*. В качестве объекта исследования использовали аутобредных белых лабораторных мышей SHK (Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, МО) в возрасте 6–8 недель с массой тела 18–20 г (n=50), иммунизированных вакциной против бруцеллеза (НПО «Микроген» Минздрава России) в дозе $3,4 \cdot 10^8$ – $4,6 \cdot 10^8$ живых м.к. в 0,5 мл 0,9 % раствора NaCl. Контрольную группу (n=50) составили лабораторные мыши, которым вводили стерильный 0,9 % раствор NaCl в объеме 0,5 мл. Взятие крови у иммунизированных и контрольных биомоделей осуществляли до вакцинации и на 14 сут после иммунизации. Исследования проводили на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с программным обеспечением BD Cell Quest, используя моноклональные антитела (МКАТ) (Invitrogen, США) к поверхностным антигенам лимфоцитов мыши, меченные FITC (флуоресцеинизотиоцианат) и PE (фикоэритрин). Определяли активационные молекулы CD25, CD69, экспрессированные лимфоцитами. Популяцию лимфоцитов идентифицировали при помощи гейтирования в координатах FSC-SSC на графике Dot Plot. События, попавшие в регион лимфоцитов, анализировали на предмет экспрессии CD69⁺, CD25⁺ рецепторов – маркеров ранней активации. Для определения фоновых значений маркеров активации стимуляцию лимфоцитов осуществляли стерильным физиологическим раствором. Реакцию активации учитывали через 24 ч после инкубации с образцами препаратов в условиях *in vitro*.

Для подтверждения воспроизводимости и достоверности полученных при исследовании результатов проводили математическую обработку значений исследуемых показателей в программе Microsoft Excel, производя расчет значения средней квадратичной ошибки отдельного измерения, выборочной дисперсии, вероятного квадратичного отклонения при двух степенях свободы с доверительной вероятностью 0,95.

Результаты и обсуждение

Получение и экспериментальное исследование антигенных препаратов, предназначенных для клеточных тестов *in vitro*, является одной из приоритетных задач при разработке методов оценки формирования и напряженности клеточного иммунитета.

Ввиду отсутствия аналоговых препаратов и стандартизированного набора характеристик, подтверждающих их диагностическую ценность, полученные в ходе разработок препараты проанализированы с помощью комплекса методов, позволяющих охарактеризовать белковую и полисахаридную часть антигена, а также сделать вывод о возможности использования данных комплексов в антиген-специфических клеточных тестах *in vitro*.

На первом этапе исследования экспериментальных серий для каждой группы образцов получены характерные спектры поглощения. Так, спектры поглощения раствора *WsAg* содержали два максимума поглощения при 218 и 260 нм и локальный минимум при 235–238 нм, а для образцов *PPBC* – максимум поглощения регистрировался при 213 и 259 нм с идентичным для *WsAg* локальным минимумом. Результаты спектрального анализа показали идентичность состава образцов и позволили подтвердить стандартность технологии их получения.

При учете особенностей спектров поглощения отдельных классов органических соединений и оценке соотношения поглощений при 260/280 нм и 260/230 нм возможно определение наличия примесей нуклеиновых кислот и белков. Значения этих соотношений для образцов *WsAg* составили $A_{(260/280)} 1,85 \pm 0,05$, $A_{(260/230)} 0,83 \pm 0,05$, а для *PPBC* – $A_{(260/280)} 1,87 \pm 0,05$, $A_{(260/230)} 1,02 \pm 0,05$, что свидетельствует об относительно низком содержании нуклеиновых кислот в образцах по сравнению с белками и подтверждается данными специфичной флуориметрии: концентрация белка – $(930,57 \pm 5,09)$ мкг/мл и $(745,06 \pm 5,01)$ мкг/мл, ДНК – $(100,06 \pm 2,16)$ мкг/мл и $(11,05 \pm 0,02)$ мкг/мл соответственно.

Для более детального изучения белковой составляющей препарата методом капиллярного электрофореза охарактеризован состав полученных белковых фракций. Так, в анализируемых образцах *WsAg* определено шесть пептидов с молекулярной массой в диапазоне от 9,23 до 45,61 кДа без преобладания каких-либо фракций по концентрации, что согласуется с результатами проверки препарата на специфичность. В свою очередь, при исследовании образцов *PPBC* на фореграммах зарегистрировано 14 пиков, но, несмотря на то, что по результатам проведенного анализа данный препарат является более гетерогенным по составу и содержит белки с массой от 10,91 до 112,47 кДа, преобладающим и основным компонентом антигенного комплекса является полипептид с молекулярной массой 33 кДа.

При изучении полисахаридного состава изготовленных экспериментальных препаратов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии подобрана методика кислотного гидролиза образцов. Анализ хроматограмм полученных гидролизатов осуществляли путем сравнения со временем удерживания образцов моно- и дисахаридов (D-глюкоза, галактозамин, сахароза, лактоза, ксилоза, галактоза, рамноза, арабиноза, фруктоза): время удерживания

углеводных компонентов *PPBC* – $(4,90 \pm 0,10)$ мин и $(6,64 \pm 0,10)$ мин, что соответствует хроматограммам стандартных образцов рамнозы – $(4,92 \pm 0,10)$ мин и D-глюкозы – $(6,64 \pm 0,10)$ мин, в свою очередь время удерживания углеводных компонентов *WsAg* – $(4,90 \pm 0,10)$ мин, $(6,06 \pm 0,10)$ и $(6,61 \pm 0,10)$ мин, что соотносится с сигналами рамнозы, арабинозы и D-глюкозы. Отсутствие других пиков на хроматограммах свидетельствует о полном кислотном гидролизе углеводной части антигенных препаратов. Воспроизводимость хроматограмм разных серий составила $(98,0 \pm 0,5) \%$, что свидетельствует о стандартности технологического процесса полученных продуктов. Отсутствие дополнительного пика арабинозы в гидролизате *PPBC* связано с особенностями его получения и не влияет на его антигенные свойства, которые в большей степени связаны с белковой составляющей.

Проверка преципитирующей активности полученных антигенных комплексов в РИД позволила определить специфический титр образцов, который составил 1:128 для *PPBC* и 1:64 для *WsAg*.

Изготовленные экспериментальные серии антигенных комплексов (*WsAg* и *PPBC*) прошли апробацию при постановке антигенспецифических клеточных тестов *in vitro*, по результатам которой определены специфичность и специфическая активность препаратов.

Анализ результатов изучения интенсивности активирующего влияния антигена *WsAg* на лимфоциты свидетельствовал о неконтролируемой индуцированной активации популяции лимфоцитов *in vitro*, что указывает на неспецифические реакции клеток в присутствии данного антигена. Антиген *PPBC* не вызывал неспецифических реакций – не способствовал *in vitro* активации лимфоцитов у биомоделей, неиммунных к возбудителю бруцеллеза (рис. 1).

Проведенные исследования показали, что интенсивность экспрессии маркеров активации лимфоцитов в контрольной группе при стимуляции изотоническим 0,9 % раствором NaCl и *PPBC* не

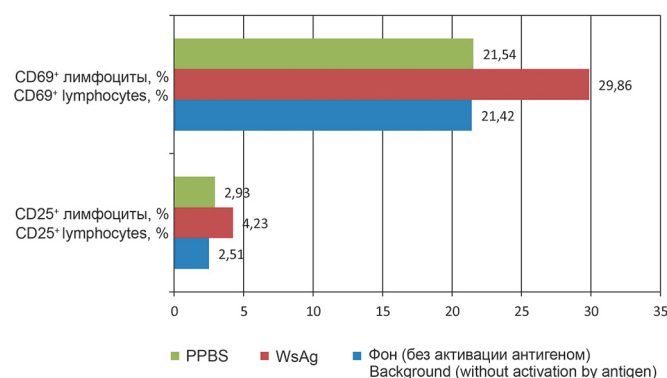


Рис. 1. Интенсивность фоновой и антигениндуцированной активации *in vitro* лимфоцитов у биомоделей, неиммунных к возбудителю бруцеллеза

Fig. 1. Intensity of the background and antigen-induced activation of lymphocytes in biomodels that have no immunity to brucellosis agent *in vitro*

имела статистически значимой разницы во все сроки исследования. Это указывает на то, что *PPBC* не вызывает неспецифической реакции лимфоцитов *in vitro*. Вероятно, как определено нами ранее, наличие в антигенном комплексе *PPBC* полипептида с молекулярной массой 33 кДа (как основного компонента) и более низкое содержание ДНК (на один порядок ниже, чем в *WsAg*) обуславливают специфичность препарата, применение которого не вызывает спонтанной экспрессии лимфоцитов.

На следующем этапе исследовали интенсивность экспрессии лимфоцитами иммунизированных *B. abortus* 19 BA биологических моделей «ранних» активационных молекул – CD69 и CD25 под влиянием антигенного комплекса *PPBC*. Показано, что при инкубации смешанной культуры лейкоцитов, иммунных к возбудителю бруцеллеза биологических моделей, в среде антигенным комплексом *PPBC* возникает активация лимфоцитов, что выражается увеличением в 2,8 раза интенсивности экспрессии лимфоцитами рецептора к IL-2 (CD25), составив в среднем $(8,65 \pm 1,85) \%$ (фоновые значения – $(3,73 \pm 0,40) \%$). По результатам анализа специфической активности *PPBC* по маркеру ранней пролиферации лимфоцитов (CD69) определено, что на 14 сут после иммунизации антигенный комплекс способствовал увеличению, в сравнении с фоновыми значениями $(23,07 \pm 1,87 \%)$, интенсивности экспонирования CD69 более чем в 2 раза – $(46,81 \pm 4,53) \%$ (рис. 2).

Экспериментально доказано, что в течение всего срока испытания *PPBC* (в масштабе реального времени) лиофилизированный препарат сохранял стабильность без изменения внешнего вида, растворимости, pH, содержания белка, специфичности и специфической активности *in vitro*. В течение 12 месяцев наблюдения качественные показатели препарата оставались в пределах установленных интервалов при температуре хранения от 2 до 8 °C. В процессе применения восстановленный в физиологическом растворе препарат характеризуется стабильностью своих биологических и физико-

химических свойств в течение 3 месяцев при температуре хранения -18 °C.

Таким образом, в результате исследований определены физико-химические характеристики, изучены хроматографические профили и состав белковых фракций, а также специфичность и специфическая активность *in vitro* экспериментальных серий изготовленных антигенных препаратов. Анализ полученных результатов позволяет заключить, что белковый и полисахаридный состав полученных образцов *WsAg* исключает возможность использования данного препарата для клеточных тестов, так как его применение способствует проявлению неспецифических реакций лимфоцитов *in vitro*. В свою очередь, комплексный антиген *PPBC* не вызывает неспецифических реакций (неспецифической активации) лимфоцитов *in vitro*, обладает выраженной специфической активностью в условиях *in vitro* и имеет перспективы использования при разработке эффективных методических подходов для лабораторной диагностики бруцеллеза, а также при оценке фактической привитости контингентов риска после вакцинации. В настоящее время, как уже отмечено ранее, на российском рынке диагностических тест-систем отсутствуют антигенные препараты для постановки клеточных тестов. Полученные данные позволяют обеспечить надлежащее качество разработанного экспериментального препарата с учетом современных правил валидации и стандартизации при производстве комплексного бруцеллезного антигена *PPBC*, предназначенного для клеточных тестов *in vitro*.

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

Список литературы

- Byndloss M.X., Tsolis R.M. *Brucella* spp. virulence factors and immunity. *Annual Review of Animal Biosciences*. 2016; 4:111–27. DOI: 10.1146/annurev-animal-021815-111326.
- Głowacka P., Zakowska D., Naylor K., Niemcewicz M., Bielawska-Drózd A. *Brucella* – virulence factors, pathogenesis and treatment. *Polish Journal of Microbiology*. 2018; 67(2):151–61. DOI: 10.21307/pjm-2018-029.
- Amjadi O., Rafiei A., Mardani M., Zafari P., Zarifian A. A review of the immunopathogenesis of Brucellosis. *Infect. Dis. (Lond)*. 2019; 51(5):321–33. DOI: 10.1080/23744235.2019.1568545.
- Smith J.A. *Brucella* Lipopolysaccharide and pathogenicity: The core of the matter. *Virulence*. 2018; 9(1):379–82. DOI: 10.1080/21505594.2017.1395544.
- Avila-Calderón E.D., Flores-Romo L., Sharon W., Donis-Maturano L., Becerril-García M.A., Arreola M.G.A., Reynoso B.A., Güemes F.S., Contreras-Rodríguez A. Dendritic cells and *Brucella* spp. interaction: the sentinel host and the stealthy pathogen. *Folia Microbiol (Praha)*. 2020; 65(1):1–16. DOI: 10.1007/s12223-019-00691-6.
- Брико Н.И., Онищенко Г.Г., Покровский В.И. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство»; 2019. Т. 1. 880 с.
- Костюченко М.В., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Санникова И.В., Дейнека Д.А., Голубь О.Г. Перспектива оценки антигенреактивности лимфоцитов *in vitro* для диагностики острого бруцеллеза. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(1):91–6. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-1-91-96.
- Костюченко М.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Курчева С.А., Бердникова Т.В., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Изучение формирования клеточного поствакцинального иммунитета против бруцеллеза в лимфоцитарных те-

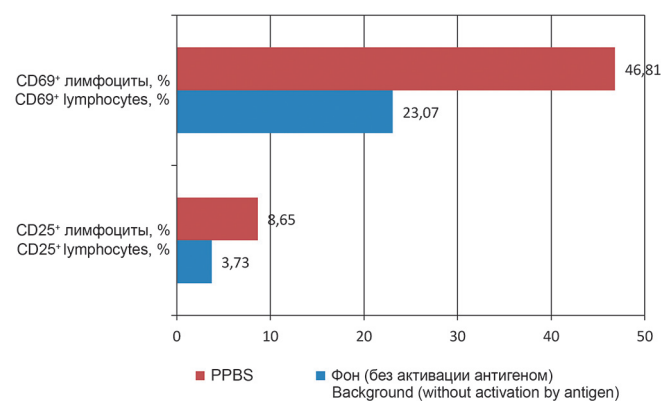


Рис. 2. Интенсивность фоновой и индуцированной *PPBC* активации *in vitro* лимфоцитов у биомodelей, иммунных к возбудителю бруцеллеза

Fig. 2. Intensity of the background and *PPBC*-induced activation of lymphocytes in biomodels that have immunity to brucellosis agent *in vitro*

стах *in vitro* с использованием экспериментального антигенного комплекса. *Медицинская иммунология*. 2019; 21(3):547–54. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-547-554.

9. Пономаренко Д.Г. Новый подход к комплексной оценке иммунобиологической реактивности контингента, подлежащего вакцинации (ревакцинации) против бруцеллеза. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2015; 3:28–31.

10. Budak F., Bal S.H., Tezcan G., Akalin E.H., Yilmaz A., Hiz P., Oral H.B. The microRNA expression signature of CD4⁺ T cells in the transition of brucellosis into chronicity. *PLoS One*. 2018; 13(6):e0198659. DOI: 10.1371/journal.pone.0198659.

11. Starska K., Glowacka E., Kulig A., Lewy-Trenda I., Bryś M., Lewkowicz P. Prognostic value of the immunological phenomena and relationship with clinicopathological characteristics of the tumor – the expression of the early CD69⁺, CD71⁺ and the late CD25⁺, CD26⁺, HLA/DR⁺ activation markers on T CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in squamous cell laryngeal carcinoma. Part II. *J. Folia Histochem. Cytobiol.* 2011; 49(4):593–603. DOI: 10.5603/FHC.2011.0082.

12. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica Chimica Acta*. 2012; 413(17–18):1338–49. DOI: 10.1016/j.cca.2011.11.006.

13. Shevach E.M., McHugh R.S., Piccirillo C.A., Thornton A.M. Control of T-cell activation by CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol. Rev.* 2001; 182:58–67. DOI: 10.1034/j.1600-065-x.2001.1820104.x.

14. Moreno-Lafont M.C., López-Santiago R., Zumarán-Cuellar E., Paredes-Cervantes V., López-Merino A., Estrada-Aguilera A., Santos-Argumedo L. Antigen-specific activation and proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes from brucellosis patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002; 96(3):340–7. DOI: 10.1016/s0035-9203(02)90119-7.

15. Coria L.M., Ibañez A.E., Pasquevich K.A., González Cobiello P.L., Frank F.M., Giambartolomei G.H., Cassataro J. *Brucella abortus* Omp19 recombinant protein subcutaneously co-delivered with an antigen enhances antigen-specific T helper 1 memory responses and induces protection against parasite challenge. *Vaccine*. 2016; 34(4):430–7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.12.012.

References

1. Byndloss M.X., Tsolis R.M. *Brucella* spp. virulence factors and immunity. *Annual Review of Animal Biosciences*. 2016; 4:111–27. DOI: 10.1146/annurev-animal-021815-111326.

2. Glowacka P., Zakowska D., Naylor K., Niemcewicz M., Bielawska-Drózd A. *Brucella* – virulence factors, pathogenesis and treatment. *Polish Journal of Microbiology*. 2018; 67(2):151–61. DOI: 10.21307/pjm-2018-029.

3. Amjadi O., Rafiei A., Mardani M., Zafari P., Zarifian A. A review of the immunopathogenesis of Brucellosis. *Infect. Dis. (Lond)*. 2019; 51(5):321–33. DOI: 10.1080/23744235.2019.1568545.

4. Smith J.A. *Brucella* Lipopolysaccharide and pathogenicity: The core of the matter. *Virulence*. 2018; 9(1):379–82. DOI: 10.1080/21505594.2017.1395544.

5. Avila-Calderón E.D., Flores-Romo L., Sharon W., Donis-Maturano L., Becerril-García M.A., Arreola M.G.A., Reynoso B.A., Güemes F.S., Contreras-Rodríguez A. Dendritic cells and *Brucella* spp. interaction: the sentinel host and the stealthy pathogen. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2020; 65(1):1–16. DOI: 10.1007/s12223-019-00691-6.

6. Briko N.I., Onishchenko G.G., Pokrovsky V.I. Guidelines on epidemiology of infectious diseases [in 2 vols.]. Moscow: “Medical information Agency” Publishing house; 2019. Vol. 1. 880 p.

7. Kostyuchenko M.V., Ponomarenko D.G., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Sannikova I.V., Deyneka D.A., Golub' O.G. Prospect of assessment of lymphocyte antigen-reactivity *in vitro* for diagnostics of acute brucellosis. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2019; 21(3):547–54. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-1-91-96.

8. Kostyuchenko M.V., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Logvinenko O.V., Kurcheva S.A., Berdnikova T.V., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. Studying development of post-vaccinal cellular immunity against brucellosis by means of lymphocyte *in vitro* tests using an experimental antigenic complex. *Meditsinskaya Immunologiya [Medical Immunology]*. 2019; 21(3):547–54. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-547-554.

9. Ponomarenko D.G. A new approach to comprehensively assessing immunobiological responsiveness in a cohort to be vaccinated (revaccinated) against brucellosis. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]*. 2015; 3:28–31.

10. Budak F., Bal S.H., Tezcan G., Akalin E.H., Yilmaz A., Hiz P., Oral H.B. The microRNA expression signature of CD4⁺ T cells in the transition of brucellosis into chronicity. *PLoS One*. 2018; 13(6):e0198659. DOI: 10.1371/journal.pone.0198659.

11. Starska K., Glowacka E., Kulig A., Lewy-Trenda I., Bryś M., Lewkowicz P. Prognostic value of the immunological phenomena and relationship with clinicopathological characteristics of the tumor – the expression of the early CD69⁺, CD71⁺ and the late CD25⁺, CD26⁺, HLA/DR⁺ activation markers on T CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in squamous cell laryngeal carcinoma. Part II. *J. Folia Histochem. Cytobiol.* 2011; 49(4):593–603. DOI: 10.5603/FHC.2011.0082.

12. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica Chimica Acta*. 2012; 413(17–18):1338–49. DOI: 10.1016/j.cca.2011.11.006.

13. Shevach E.M., McHugh R.S., Piccirillo C.A., Thornton A.M. Control of T-cell activation by CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol. Rev.* 2001; 182:58–67. DOI: 10.1034/j.1600-065-x.2001.1820104.x.

14. Moreno-Lafont M.C., López-Santiago R., Zumarán-Cuellar E., Paredes-Cervantes V., López-Merino A., Estrada-Aguilera A., Santos-Argumedo L. Antigen-specific activation and proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes from brucellosis patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002; 96(3):340–7. DOI: 10.1016/s0035-9203(02)90119-7.

15. Coria L.M., Ibañez A.E., Pasquevich K.A., González Cobiello P.L., Frank F.M., Giambartolomei G.H., Cassataro J. *Brucella abortus* Omp19 recombinant protein subcutaneously co-delivered with an antigen enhances antigen-specific T helper 1 memory responses and induces protection against parasite challenge. *Vaccine*. 2016; 34(4):430–7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.12.012.

Authors:

Kurcheva S.A., Kovalev D.A., Ponomarenko D.G., Siritsa Yu.V., Kostyuchenko M.V., Koshkid'ko A.G., Zharnikova I.V., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Zhirov A.M. Stavropol Research Anti-Plague Institute, 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Об авторах:

Курчева С.А., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Сирица Ю.В., Костюченко М.В., Кошкидько А.Г., Жарникова И.В., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Жиров А.М. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-89-96

УДК 616.932(470)

Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, Н.Е. Гаевская, А.С. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая

ФЕНО- И ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ*ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация*

Цель. Анализ фенотипической характеристики и выявление особенностей генотипической организации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, имеющих различное происхождение и изолированных на территории России. **Материалы и методы.** Использована выборка из 548 нетоксигенных штаммов, полученная с помощью авторской пополняемой ГИС «Холера 1989–2014». ПЦР-генотипирование проводили в соответствии со «Способом идентификации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы с помощью ПЦР для выделения генетических детерминант». Кластерный анализ проводили с использованием метода UPGMA. Построение дендрограммы осуществляли с помощью программы MEGA 5. **Результаты и обсуждение.** Показана типичность штаммов *V. cholerae* по культурально-морфологическим, серологическим и биохимическим свойствам. Выявлена изменчивость изучаемых штаммов по признаку фаголизабельности. Определены уникальные фаготипы, ранее не встречавшиеся на территории России. Популяция нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O139 серогруппы была генетически однородной в отличие от изолятов *V. cholerae* O1 El Tor и имела идентичные ПЦР-генотипы. Показана универсальность метода ПЦР-генотипирования по 14 генам-мишеням, позволяющего дифференцировать изученные штаммы *V. cholerae* O1 и O139, а также выявлять различия среди штаммов O139, выделенных в различных географических регионах страны.

Ключевые слова: холерный вибрион, фено- и генотип, нетоксигенные штаммы, объекты окружающей среды.

Корреспондирующий автор: Левченко Дарья Александровна, e-mail: levchenko_da@antiplague.ru.

Для цитирования: Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б. Фено- и генотипические особенности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов различного происхождения, изолированных на территории России. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; 3:89–96. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-89-96

Поступила 20.11.19. Отправлена на доработку 27.01.20. Принята к публ. 25.03.20.

D.A. Levchenko, V.D. Kruglikov, N.E. Gaevskaya, A.S. Vodop'yanov, N.B. Nepomnyashchaya
Pheno- and Genotypical Features of Non-Toxigenic Strains of Cholera Vibrios of Different Origins, Isolated in the Territory of Russia

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

Abstract. Aim. Analysis of the phenotypic characteristics and identification of peculiarities of the genotypic organization in non-toxigenic strains of cholera vibrios having different origin, isolated in Russia. **Materials and methods.** A sample of 548 non-toxigenic strains obtained using the author's updated GIS "Cholera 1989–2014" was used. PCR genotyping was carried out in accordance with the patented "Method for the identification of non-toxigenic strains of cholera vibrio O1 serogroup using PCR to isolate genetic determinants." Cluster analysis was performed applying the UPGMA method. The dendrogram was constructed using MEGA 5 software package. **Results and discussion.** Representative cultural-morphological, serological and biochemical properties of *V. cholerae* strains have been specified. The variability of the studied strains on the basis of phagolizability has been revealed. Unique phage-types not previously encountered in Russia have been identified. The population of non-toxigenic strains of cholera vibrio O139 serogroup is genetically homogeneous in contrast to *V. cholerae* O1 El Tor isolates and has identical PCR genotypes. The universality of the PCR genotyping by 14 target genes has been shown to differentiate the studied strains of *V. cholerae* O1 and O139, as well as to identify disparities among O139 strains isolated in different geographical regions of the country.

Key words: *Vibrio cholerae*, pheno- and genotype, non-toxigenic strains, environmental objects.

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

Corresponding author: Dar'ya A. Levchenko, e-mail: levchenko_da@antiplague.ru.

Citation: Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Gaevskaya N.E., Vodop'yanov A.S., Nepomnyashchaya N.B. Pheno- and Genotypical Features of Non-Toxigenic Strains of Cholera Vibrios of Different Origins, Isolated in the Territory of Russia. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2020; 3:89–96 (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-89-96

Received 20.11.19. Revised 27.01.20. Accepted 25.03.20.

Levchenko D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5073-2918>

Kruglikov V.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4749-3837>

Gaevskaya N.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0762-3628>

Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8884-9681>

Nepomnyashchaya N.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0868-6791>

Территория Российской Федерации (РФ) не является эндемичной по холере. В ряде субъектов с

водными экосистемами, такими как реки Волга, Обь, Амур, Дон, Нева, Таганрогский залив и др., обнару-

живались единичные токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 (заносы) и периодически регистрировалось выделение нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 и O139, а также отмечалось их переживание на протяжении летнего периода, что указывает на необходимость выявления потенциальных и реальных рисков контаминации холерными вибрионами данных серогрупп водных объектов окружающей среды (ООС) [1]. В связи с этим прогноз по холере на 2020 г. для России определяют как неблагоприятный, что обусловлено потенциальными рисками завоза болезни, связанными с посещением стран, неблагополучных по холере [2].

Установлено, что штаммы *V. cholerae*, выделяемые из ООС в РФ, могут рассматриваться как резервуар генов факторов патогенности [3]. Отмечено появление в окружающей среде клонов, не имеющих полного кластера коровой области СТХф, но содержащих остров патогенности VPI-1. Считается, что штаммы, имеющие ген *tcpA*, могут явиться этиологическим фактором спорадических случаев или вспышек острых кишечных инфекций (ОКИ). Так, в различных регионах РФ зарегистрированы случаи выделения нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor от людей, в том числе содержащих ген токсин-регулируемых пилей (TCP), обеспечивающих колонизацию тонкого кишечника [4, 5].

Помимо токсинов, холерные вибрионы продуцируют множество других факторов, связанных с патогенностью или персистенцией вне организма хозяина. Это, прежде всего, пили адгезии и ферменты патогенности, такие, например, как нейраминидаза и ген (*nanH*), который находится в центральной части острова патогенности VPI-2 [6, 16].

В конце прошлого и в нынешнем веке на территориях различных субъектов России установлены случаи контаминации нетоксигенными штаммами *V. cholerae* O139 поверхностных водоемов, используемых в качестве источников водоснабжения и водопользования. Штаммы холерных вибрионов O139 серогруппы разного происхождения отличались по своим генетическим свойствам. Изоляты, полученные от больных, характеризовались полным набором генов патогенности (*ctxAB*, *zot*, *ace*, *tcpA*, *toxT* и *toxR*), в то же время штаммы, выделенные из ООС, не имели генов токсигенности, но содержали регуляторный ген (*toxR*) и ген гемагглютинин-протеазы *hap* [7].

Одной из задач эпидемиологического анализа является выявление генетических связей между штаммами *V. cholerae* со сходными фенотипическими свойствами, имеющими различное происхождение, методом молекулярного типирования, который позволит в кратчайшие сроки выявить различия сравниваемых штаммов холерных вибрионов.

Цель исследования состояла в изучении фенотипической характеристики и выявлении особенностей генотипической организации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, имеющих различ-

ное происхождение, изолированных на территории России.

Материалы и методы

Для осуществления сравнительного анализа использовали выборку из 548 нетоксигенных штаммов, из которых 538 штаммов *V. cholerae* O1 и O139 выделены из ООС, а 10 культур холерных вибрионов O1 изолированы от людей. Комплексная информация о фено- и генотипической организации водных штаммов (с привязкой к территории) получена с помощью авторской пополняемой ГИС «Холера 1989–2014». При отборе клинических штаммов использовались первичные документы (паспорта штаммов). Идентификацию микроорганизмов осуществляли в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». ПЦР-генотипирование проводили в соответствии со «Способом идентификации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы с помощью ПЦР для выделения генетических детерминант» (Патент на изобретение № 2665542). Кластерный анализ, отражающий филогенетические связи штаммов по распределению ПЦР-генотипов, проводили с использованием метода UPGMA. Построение дендрограммы осуществляли с помощью программы MEGA 5 [8, 9].

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что культуры *V. cholerae* O1 в основном являлись типичными по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам. К серовару Ogawa принадлежали 272 штамма (51,7 %), к серовару Inaba – 243 штамма (46,2 %), к серовару Nikojima – 2 штамма (0,4 %), а к R-варианту относились 9 штаммов (1,7 %). У 22 штаммов *V. cholerae* (4,1 %) выявлена принадлежность к O139 серогруппе. К биовару El Tor отнесены 526 (96,0 %) штаммов по ряду тестов, а именно: по возможности образовывать ацетилметилкарбинол в реакции Фогеса – Проскауэра, а также по определению биовароспецифичных маркеров методом ПЦР (*ctxB*, *rtxC*, *cas3*).

В последние годы регистрируется высокая устойчивость выделяемых штаммов холерных вибрионов к холерному диагностическому бактериофагу эльтор. Атипичность по признаку фаголизальности определена у 455 штаммов (83,0 %). В ряде публикаций показано, что вероятными причинами изменения фагочувствительности холерных вибрионов к диагностическим бактериофагам являются генетические изменения штаммов *V. cholerae* El Tor [10–12].

По результатам фаготипирования штаммов холерных вибрионов установлены 14 различных фаготипов. В ходе проведенного анализа удалось установить принадлежность к определенному фаготипу у 82 (15,0 %) штаммов *V. cholerae* O1 El Tor. При анализе

82 штаммов с установленным фаготипом выявлено, что наибольшее количество культур принадлежало к фаготипу 13 (28 штаммов – 34,6 %). Так, фаготип 13 встречался на территориях Ростовской области (2002, 2007, 2011 гг.), Республики Калмыкия (2003, 2011, 2012, 2013, 2015 гг.), Хабаровского края (2013 г.), Ленинградской (2002 г.) и Новгородской (2002 г.) областей. Наряду с этим выявлены уникальные фаготипы, ранее не встречавшиеся на территории России: фаготип 7 (Приморский край, 2017 г.), фаготип 8 (Хабаровский край, 2016 г.), фаготип 14 (Ростовская область, 2007 г.), фаготип 18 (Забайкальский край, 2018 г.) и фаготип 20 (Кировская область, 2018 г.).

Дальнейший этап работы заключался в анализе результатов ПЦР-генотипирования нетоксигенных штаммов холерных вибрионов (по 14 генам-мишеням). В результате определены кластеры/генотипы исследуемых штаммов. При исследовании 548 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* выявлено 105 генотипов, объединенных в 13 кластеров (таблица).

Особый интерес представляли нетоксигенные штаммы холерных вибрионов O1 серогруппы с генетической характеристикой *ctxA-tcpA*⁺. В ряде публикаций установлена филогенетическая связь между штаммами *V. cholerae ctxA-tcpA*⁺ и *ctxA-tcpA*⁻ на основе SNP-типирования [13, 14]. Однако в исследованиях Н.И. Смирновой и соавт. показано, что нетоксигенные штаммы *ctxA-tcpA*⁺*VSP*⁻ и *ctxA-tcpA*⁻*VSP*⁻ относятся к двум филогенетически обособленным группам [15].

По результатам данного исследования выявлено, что нетоксигенные штаммы *V. cholerae ctxA-tcpA*⁺ об-

разовали две количественно схожие группы. Первая группа, состоящая из 37 изолятов (54,4 %), включала 20 генотипов, объединенных в шесть кластеров (D, E, F, G, H и I), и была представлена только штаммами *V. cholerae* O1 с генетической характеристикой *ctxA-tcpA*⁺. Изоляты этой группы характеризовались различным набором генов, причем у шести штаммов (8,8 %) выявлен редко встречающийся ген термостабильного токсина (*stn/sto*). Особенностью данной группы явилось наличие генов системы секреции шестого типа T6SS (*acd-vgrG1*, *pbd-vgrG3*, *vasK*) у 95,0 %, а также генов *rtxC* – активатора MARTX и активного домена MARTX (*acd-rtxA*) у 43,2 % штаммов холерных вибрионов. Вторую группу составил 31 штамм (45,6 %), все штаммы данной группы состояли из семи генотипов (два кластера – А и С) и входили в общие кластеры с культурами *ctxA-tcpA*⁻. Наибольший интерес вызвали штаммы *V. cholerae* O1, образовавшие кластер С (27 штаммов). Отличительной чертой изолятов данного кластера явилась их гетерогенность. Однако у всех штаммов холерных вибрионов выявлен структурный ген системы секреции шестого типа T6SS (*vasK*); у 77,8 % (21 штамм) обнаружен ген маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*); у 29,6 % (восемь штаммов) присутствовали гены кластера системы секреции третьего типа T3SS (*vcsN2*, *vspD*). У этих штаммов не выявлены гены *rtxC* – активатора MARTX и активного домена MARTX (*acd-rtxA*), ген *rstA* (RS1-элемента), а также ген термостабильного токсина (*stn/sto*). Остальные гены представлены различным сочетанием (рис. 1).

Генотипическая характеристика штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории Российской Федерации
Genotypic characteristics of *V. cholerae* strains isolated in the territory of the Russian Federation

Кластер Cluster	RS1, RS2	VPI-1	VPI-2			MARTX		T6SS			T3SS		<i>mshA</i>	<i>stn/sto</i>	Кол-во штаммов Number of strains
Ген Gene	<i>rstA</i>	<i>tcpAelt</i>	<i>int</i>	<i>nanH</i>	<i>vce</i>	<i>rtxC</i>	<i>acd-rtxA</i>	<i>acd-vgrG1</i>	<i>pbd-vgrG3</i>	<i>vasK</i>	<i>vcsN2</i>	<i>vspD</i>			
ПЦР-кластер (генотип) PCR cluster (genotype)															
A (A1-A41)	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	-	-	+/-	+/-	193
B (B1-B7)	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	+	-	128
C (C1-C9)	-	+/-	+	+	+/-	+	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-	+/-	-	40
D (D1)	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	1
E (E1-E7)	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	-	-	+/-	-	20
F (F1-F3)	-	+	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+/-	3
G (G1)	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	1
H (H1-H6)	+/-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	10
I (I1-I2)	-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	2
J (J1)	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	1
K (K1-K15)	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+/-	+/-	90
L (L1-L11)	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+/-	+/-	58
M (M1)	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	1
Итого: Total:															548

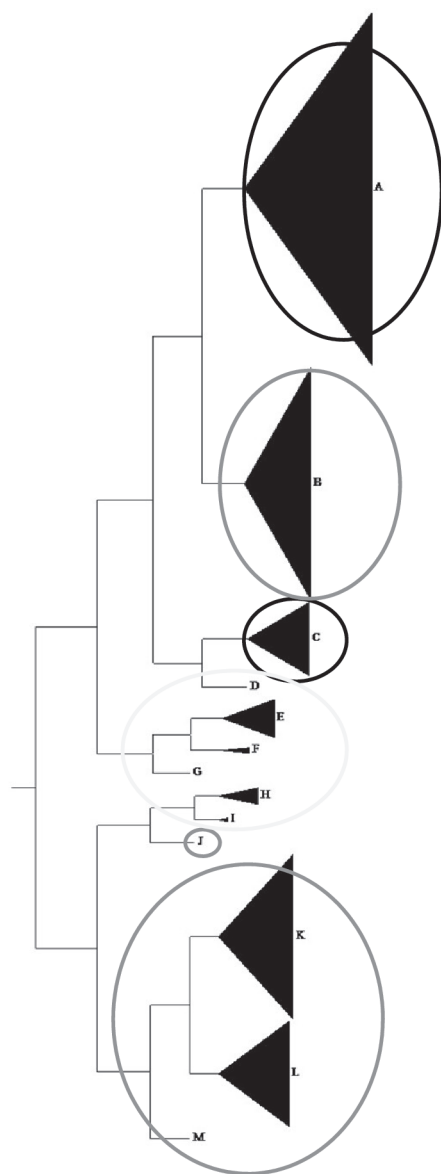


Рис. 1. Дендрограмма ПЦР-генотипов штаммов холерных вибрионов, выделенных из ООС и от людей на территории России:

серым цветом выделены нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA tcpA*⁺; черным цветом – нетоксигенные штаммы с генетической характеристикой как *ctxA tcpA*⁺, так и *ctxA tcpA*[–]; темно-серым цветом – штаммы с генетической характеристикой *ctxA tcpA*[–]

Fig. 1. Dendrogram of PCR genotypes of cholera vibrio strains isolated from environmental objects and from people in Russia:

the first group of strains is highlighted in gray (non-toxicogenic strains of *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA tcpA*⁺). Black color indicates the second group of non-toxicogenic strains of cholera vibrios with a genetic characteristic of both, *ctxA tcpA*⁺ and *ctxA tcpA*[–]. Dark gray color indicates strains with the genetic characteristic *ctxA tcpA*[–]

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что выявленные штаммы холерных вибрионов O1 серогруппы с генетической характеристикой *ctxA tcpA*⁺ и *ctxA tcpA*[–] на различных территориях РФ, по всей видимости, способны к сохранению в водной среде в течение продолжительного времени и, возможно, имеют заносное происхождение.

К числу факторов патогенности холерных вибрионов относят нейраминидазу, которая может

играть определенную роль в развитии легкой формы инфекции или кратковременного носительства [6]. Так, при отсутствии заболеваемости холерой отмечается разнообразие структуры генома по наличию гена *nanH* среди холерных вибрионов, выделенных из ООС. *NanH*-положительными оказались 77,5 % (417 из 548) исследуемых штаммов. Важно отметить, что, по данным полногеномного секвенирования, нуклеотидная последовательность этого гена у многих нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, выделенных из ООС на территории в России, изменена [15].

Присутствие генов фермента нейраминидазы в геноме штаммов холерных вибрионов разного происхождения, возможно, связано с тем, что продукт этого гена необходим вибриону не только во время инфекционного процесса, но и при адаптации микроорганизма к условиям среды обитания. При этом способность части вибрионов из поверхностных водоемов продуцировать нейраминидазу, возможно, дает им определенные преимущества в процессе выживания в стрессовых условиях водной среды [6, 14–17].

На рис. 2 показано, что среди нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор самым распространенным оказался кластер К (90 штаммов – 16,4 %), генотипы (15) которого выявлены на территории 29 субъектов всех федеральных округов. Остальные кластеры состояли из различного количества генотипов. Так, кластер А включал 41 генотип (193 штаммов – 35,2 %), L – 11 генотипов (58 штаммов – 10,6 %), С – 9 генотипов (40 штаммов – 7,3 %), В – 7 генотипов (128 штаммов – 23,4 %), Е – 7 генотипов (21 штамм – 3,8 %), Н – 6 генотипов (девять штаммов – 1,6 %), F – 3 генотипа (три штамма – 0,5 %), I – 2 генотипа (два штамма – 0,4 %), D, G, J и M – по одному генотипу (по одному штамму – 0,2 %).

Обращает на себя внимание широкое распространение в ООС в России генотипа К6, включающего 29 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор и представленного следующим набором генов: *int*, *nanH* (гены сайта интеграции и нейраминидазы острова патогенности VPI-2); *rtxC* – активатора MARTX и активного домена MARTX (*acd-rtxA*); *vasK* (структурный ген кластера системы секреции шестого типа T6SS); гены кластера системы секреции третьего типа T3SS (*vcsN2*, *vspD*) и маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*). Данный генотип обнаружен в поверхностных водоемах 22 административных территорий России семи ФО: Южный, Крымский, Северо-Западный, Центральный, Приволжский, Сибирский и Северо-Кавказский. По данным литературы, кластер MARTX тесно связан с СТХ-профагом, а ген *rtxA* присутствует в геноме большинства нетоксигенных штаммов Эль Тор, обычно в этих штаммах определяется и *rtxC*. В ряде публикаций [18, 19] показано участие маннозочувствительных пилей в формировании биопленок на абиотических и биотических поверхностях, что способствует длительному

Федеральный округ Federal District	Регион Region	Генотипы Genotypes																			
Южный федеральный округ Southern Federal District	Ростовская область Rostov Region	A2	A7	A23	A24	A28	B2	C3	C8	C9	E2	E4	E6	E7	H1	H2	H6	K2			
	Республика Калмыкия Republic of Kalmykia	K5	K9	K10	K11	L2	L7	J1	M1	G1	F3										
		A2	A4	A5	A6	A8	A10	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A27	A34		
		A35	A38	A39	A40	A41	B2	B7	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C9	D1	E1	E5		
	E6	H2	H3	H4	H5	K1	K4	K5	K11	K12	L4	L5	L6	L7	L9	L10	Π	Π	I2		
	Астраханская область Astrakhan Region	A3	A36	B1																	
Волгоградская область Volgograd Region	K6																				
Краснодарский край Krasnodar Region	A6	A7	A25	A26	A29	A35	B1	K6	K14	L2											
Крымский федеральный округ Crimean Federal District	Республика Крым Republic of Crimea	K3	K6	L3																	
Северо-Западный федеральный округ Northwestern Federal District	Республика Коми Komi Republic	F1																			
	Архангельская область Arkhangelsk Region	K6																			
	Калининградская область Kaliningrad Region	L5																			
	Ленинградская область Leningrad Region	A32	K6	L7																	
	Новгородская область Novgorod Region	K6																			
	Псковская область Pskov Region	K6																			
Дальневосточный федеральный округ Far Eastern Federal District	Приморский край Primorsky Region	A3	A11	K2	K8	L8															
	Амурская область Amur Region	A30																			
	Республика Саха Saha Republic	A37																			
	Хабаровский край Khabarovsk Region	B5	E3	L1	L2	L3	F2														
Уральский федеральный округ Ural Federal District	Свердловская область Sverdlovsk Region	B2	B3	K15	L3																
	Челябинская область Chelyabinsk Region	A1	A36	A6	K11																
	Тюменская область Tyumen Region	B6	C7																		
Центральный федеральный округ Central Federal District	Московская область Moscow Region	A2	A9	C7	K6																
	Рязанская область Ryazan Region	K6																			
	Воронежская область Voronezh Region	K13																			
	Ярославская область Yaroslavl Region	K6																			
	Тулская область Tula Region	K7																			
Приволжский федеральный округ Volga Federal District	Республика Татарстан Republic of Tatarstan	A3																			
	Кировская область Kirov Region	C7	K6																		
	Пермская область Perm Region	A31	K6																		
	Саратовская область Saratov Region	K6																			
	Нижегородская область Nizhny Novgorod Region	K6																			
	Пензенская область Penza Region	K6																			
Сибирский федеральный округ Siberian Federal District	Иркутская область Irkutsk Region	A2	A12	A28	A33	A36	C7	K6	K11												
	Кемеровская область Kemerovo Region	A2	K6																		
	Новосибирская область Novosibirsk Region	A2	K6																		
	Забайкальский край Transbaikal Region	A3	A40	K2	K6	K11	L8														
	Республика Бурятия The Republic of Buryatia	A40	L11																		
	Красноярский край Krasnoyarsk Region	K6																			
	Алтайский край Altai Region	K6																			
Северо-Кавказский федеральный округ North Caucasian Federal District	Ставропольский край Stavropol Region	A3	K6																		

Рис. 2. Распределение ПЦР-генотипов нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, выделенных из ООС и от людей на территории России

Fig. 2. Distribution of PCR genotypes of non-toxigenic strains of cholera vibrios isolated from environmental objects and from people in Russia

сохранению вибрионов в водоемах. Исходя из приведенных данных, выявлено, что штаммы с таким генотипом наиболее устойчивы к действию факторов окружающей среды и способны к переживанию на протяжении летнего периода или ряда лет.

На следующем этапе работы проведен сравнительный генотипический анализ клинических нетоксигенных штаммов холерных вибрионов и «водных» штаммов. Установлено, что нетоксигенные изоляты *V. cholerae* O1, выделенные от больных в разные годы, относились к различным генотипам. Так, штаммы холерных вибрионов, выделенные от больных в 1999 г. (два изолята – Астраханская область) и 2000 г. (два изолята – Краснодарский край), относились к генотипу B1, как и штаммы, обнаруженные в 2015 г. в Краснодарском крае, р. Агура. Отличительной особенностью таких штаммов явилось наличие генов: *int*, *nanH* (гены сайта интеграции и нейраминидазы острова патогенности VPI-2); *rtxC* – активатора MARTX и активного домена MARTX (*acd-rtxA*); *vasK* (структурный ген кластера системы секреции шестого типа T6SS) и маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*). Стоит отметить, что нетоксигенный изолят, выделенный от больного в Республике Калмыкия в 2002 г., имел одинаковый генотип K1 со штаммом, обнаруженным в р. Элистинке в 2018 г., и был представлен генами *rtxC*, *acd-rtxA* (MARTX), а также генами кластера системы секреции третьего типа T3SS (*vcsN2*, *vspD*) и маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*). Нетоксигенная культура холерного вибриона, изолированная от больного в 1999 г. в Хабаровском крае, имела уникальный генотип, ранее не встречавшийся на территории России, заключавшийся в наличии генов *rtxC*, *acd-rtxA* (MARTX); *nanH* (ген нейраминидазы острова патогенности VPI-2); *vasK* (структурный ген кластера системы секреции шестого типа T6SS) и маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*). Исключение составили штаммы холерных вибрионов, обнаруженные в водоеме Ветровский карьер в 2005 г. во время эпидосложнений в г. Каменске-Шахтинском, вызванных нетоксигенными штаммами *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA*-*tcpA*⁺, и принадлежащие к одному генотипу H1, представленному следующим набором генов: *int*, *nanH* (гены сайта интеграции и нейраминидазы острова патогенности VPI-2); *rtxC*, *acd-rtxA* (MARTX); *acd-vgrG1*, *pbd-vgrG3*, *vasK* (гены кластера системы секреции шестого типа T6SS); *vcsN2*, *vspD* (гены кластера системы секреции третьего типа T3SS) и *mshA* (гены маннозочувствительных пилей адгезии). Интересен тот факт, что на протяжении последних семи лет (2012–2018 гг.) на территории России нетоксигенных холерных вибрионов O1 серогруппы от людей выделено не было.

Что касается нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O139 серогруппы, выделенных из ООС, то они оказались генетически однородными, в сравнении с *V. cholerae* O1, и вошли в общий кластер А со штаммами O1 серогруппы. Большинство

штаммов (99,8 %) образовало отдельный генотип A2, который представлен следующим набором генов факторов патогенности/персистенции: *int*, *nanH*, *vce* (гены острова патогенности VPI-2); *vasK* *pbd-vgrG3* (транслокон и эффектор T6SS) и *rtxC*. У этих штаммов не выявлены гены *tcpA*, *stn/sto*, *mshA*, а также гены T3SS (*vcsN2*, *vspD*) и MARTX (*acd-rtxA*). Гены, кодирующие активный домен ключевого эффектора T6SS (*acd-vgrG1*), в 95,5 % случаев также не обнаружены. Такой генотип выявлен на территориях шести субъектов РФ трех ФО, а именно: Южного, Сибирского и Центрального. Стоит отметить, что исключение составил один штамм *V. cholerae* O139 (0,2 %), изолированный на территории Уральского ФО (Челябинская область) и имеющий уникальный генотип. Отличительной чертой вышеуказанного штамма явилось наличие в составе генома последовательности *acd-vgrG1*.

Таким образом, с помощью пополняемой ГИС дана расширенная характеристика по фено- и генотипическим признакам штаммов холерных вибрионов, как вновь выделенных на территории России, так и обнаруженных ранее. Проведенный ретроспективный анализ микробиологических свойств штаммов *V. cholerae* показал их типичность по культурально-морфологическим, серологическим и биохимическим свойствам. Установлено, что нетоксигенные штаммы холерных вибрионов O1 Эль Тор характеризовались устойчивостью по признаку фаголизабельности к холерному диагностическому фагу эльтор. Таким образом, сравнительный фенотипический анализ выявил изменчивость изучаемых штаммов по признаку фаголизабельности. Определены уникальные фаготипы (7, 8, 14, 18, 20), ранее не встречавшиеся на территории России. При проведении сравнительного анализа клинических нетоксигенных штаммов холерных вибрионов с «водными» выявлено, что единичные нетоксигенные изоляты *V. cholerae* O1, выделенные от больных в разные годы, относились к различным генотипам, что указывает на их заносное происхождение. Популяция нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O139 серогруппы являлась генетически однородной в отличие от изолятов *V. cholerae* O1 El Tor и имела идентичные ПЦР-генотипы. В целом распределение ветвей дендрограммы штаммов *V. cholerae* O139 отличалось от такового штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы. Установлено, что использование метода ПЦР-генотипирования по 14 генам-мишеням позволяет дифференцировать изученные штаммы *V. cholerae* O1 и O139, а также выявить различия среди штаммов O139, выделенных в различных географических регионах страны. Полученные данные свидетельствуют об актуальности проведения дальнейших исследований, направленных на изучение генетической организации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов с последующим поиском новых генетических маркеров для дифференциации клинических и водных штаммов.

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

Список литературы

1. Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Титова С.В., Москвитина Э.А., Архангельская И.В., Гаевская Н.Е., Ежова М.И. Холерные вибрионы в водоемах Российской Федерации. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(4):393–9. DOI: 10.18821/0016-9900-2019-98-4-393-399.
2. Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Куриленко М.Л., Кругликов В.Д., Титова С.В., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Лопатин А.А., Иванова С.М., Мишанькин Б.М., Кривенко А.С., Анисимова Г.Б., Носков, А.К. Холера: мониторинг эпидемиологической обстановки в мире и России (2010–2019 гг.). Прогноз на 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:38–47. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-38-47.
3. Титова С.В., Монахова Е.В., Архангельская И.В., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б. Природные популяции холерных вибрионов как резервуар генов факторов патогенности. *Здоровье населения и среда обитания*. 2016; 5:45–7.
4. Титова С.В., Монахова Е.В. О потенциальной опасности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, содержащих гены токсин-корегулируемых пилей адгезии. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2016; 5:65–72.
5. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Водопьянов С.О. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы *ctxA*⁺*tcpA*⁺, выделенных из водных объектов РФ, охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014; 9:32–5.
6. Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути ее реализации (обзор). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 4:60–8.
7. Осин А.В., Ерошенко Г.А., Коннов Н.П., Кузнецов О.С., Смирнова Н.И. Фенотипический и генетический анализ штаммов *Vibrio cholerae* O139 серогруппы, выделенных из внешней среды. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2000; 80:93–100.
8. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28:2731–9. DOI: 10.1093/molbev/msr121.
9. Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б. ПЦР-генотипирование нетоксигенных штаммов холерных вибрионов как один из подходов их актуализации в плане эпиднадзора за холерой. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2018; 2:28–35.
10. Гаевская Н.Е., Мakedonova Л.Д. Использование бактериофагов в лабораторной диагностике холеры. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 12(61):849–52. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-12-849-852.
11. Tock M.R., Dryden D.T. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005; 8(4):466–72. DOI: 10.1016/j.mib.2005.06.003.
12. Labrie S.J., Samson J., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(5):317–27. DOI: 10.1038/nrmicro2315.
13. Kuleshov K.V., Vodop'yanov S.O., Markelov M.L., Dedkov V.G., Kermanov A.V., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Mazrukho A.B., Shipulin G.A. Draft genome sequences of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains 2011 EL-301 and P-18785, isolated in Russia. *Genome announce*. 2013; 1(4):e00659-13. DOI: 10.1128/genomeA.00659-13.
14. Миронова Л.В., Балахонov С.В., Хунхеева Ж.Ю., Пономарева А.С., Басов Е.А., Гладких А.С., Боцалгин Н.О., Урбанович Л.Я. Актуальные вопросы совершенствования эпидемиологического надзора за холерой: эпидемиологические и молекулярно-генетические закономерности обнаружения холерного вибриона в объектах окружающей среды. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 5:371.
15. Смирнова Н.И., Агафонова Е.Ю., Шелканова Е.Ю., Агафонов Д.А., Краснов Я.М., Ливанова Л.Ф., Кутырев В.В. Геномное разнообразие нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенные на территории России и сопредельных стран. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2018; 2:76–86. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84.
16. Gerny W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology*. 2002; 148:3681–93. DOI: 10.1099/00221287-148-11-3681.
17. Сизова Ю.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Черепанина И.Я., Буракова О.С. Фенотипический и генотипический анализ токсинопродукции типичных и атипичных штаммов холерных вибрионов в стрессовых условиях окружающей

среды. *Современные проблемы науки и образования*. 2017; 3. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=26439> (дата обращения 03.11.2019).

18. Watnick P.I., Fullner K.J., Kolter R.A. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* 1999; 181:3606–9. DOI: 10.1128/JB.181.11.3606-3609.1999

19. Chiavelli D.A., Marsh J.W., Taylor R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(7):719–27. DOI: 10.1128/AEM.67.7.3220-3225.2001.

References

1. Kruglikov V.D., Levchenko D.A., Titova S.V., Moskvitina E.A., Arkhangelskaya I.V., Gaevskaya N.E., Ezhova M.I. [Vibrio cholerae in the waters of the Russian Federation]. *Gigiena i Sanitariya [Hygiene and Sanitation]*. 2019; 98 (4):393–9. DOI: 10.18821/0016-9900-2019-98-4-393-399.
2. Moskvitina E.A., Yanovich E.G., Kurilenko M.I., Kruglikov V.D., Titova S.V., Levchenko D.A., Vodop'yanov A.S., Lopatin A.A., Ivanova S.M., Mishan'kin B.M., Krivenko A.S., Anisimova G.B., Noskov A.K. [Cholera: Monitoring of Epidemiological Situation around the World and in Russia (2010–2019). Forecast for 2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):38–47. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-38-47
3. Titova S.V., Monakhova E.V., Arkhangel'skaya I.V., Pisanov R.V., Nepomnyashchaya N.B. [Natural populations of Vibrio cholerae as a reservoir of virulence-associated genes]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2016; 5:45–7.
4. Titova S.V., Monakhova E.V. [Potential danger of nontoxigenic *Vibrio cholerae* strains containing genes for toxin-coregulated adhesion pili]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]*. 2016; 5:65–72.
5. Zubkova D.A., Kruglikov V.D., Arkhangelskaja I.V., Vodopyanov A.S., Nepomnyashchaya N.B., Vodopyanov S.O. [Genetic features of strains *V. cholerae* O1 CTXA-TCPA+, isolated from water bodies of the Russian Federation, described using a new geoinformation systems]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2014; 9:32–4.
6. Monakhova E.V. Cholera vibrio virulence strategy and ways of its realization (scientific review). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (4):60–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-60-68.
7. Osin A.V., Eroshenko G.A., Konnov N.P., Kuznetsov O.S., Smirnova N.I. [Phenotypic and genetic analysis of *Vibrio cholerae* strains of O139 serogroup, isolated from environment]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2000; 80:93–100.
8. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28:2731–9. DOI: 10.1093/molbev/msr121.
9. Kruglikov V.D., Levchenko D.A., Vodopyanov A.S., Nepomnyashchaya N.B. [PCR genotyping of non-toxigenic *Vibrio cholerae* strains as one of approaches to their actualization in terms of epidemiological surveillance of cholera]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]*. 2018; 2:28–35.
10. Gaevskaya N.E., Makedonova L.D. [The application of bacteriophages in laboratory diagnostic of cholera]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2016; 12(61):849–52. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-12-849-852.
11. Tock M.R., Dryden D.T. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005; 8(4):466–72. DOI: 10.1016/j.mib.2005.06.003.
12. Labrie S.J., Samson J., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(5):317–27. DOI: 10.1038/nrmicro2315.
13. Kuleshov K.V., Vodop'yanov S.O., Markelov M.L., Dedkov V.G., Kermanov A.V., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Mazrukho A.B., Shipulin G.A. Draft genome sequences of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains 2011 EL-301 and P-18785, isolated in Russia. *Genome announce*. 2013; 1(4):e00659-13. DOI: 10.1128/genomeA.00659-13.
14. Mironova L.V., Balakhonov S.V., Khunkheeva Zh.Yu., Ponomareva A.S., Basov E.A., Gladkikh A.S., Bochalgin N.O., Urbanovich L.Ya. [Relevant issues of improvement of epidemiological surveillance over cholera: epidemiological and molecular-genetic regularities of cholera vibrio detection in environmental objects]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2017; 5:371.

15. Smirnova N.I., Agafonova E.Y., Shchelkanova E.Yu., Agafonov D.A., Krasnov Ya.M., Livanova L.F., Kutyrev V.V. [Genomic diversity of nontoxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in the territory of Russia and neighboring states]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2018; 2:76–84. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84.
16. Germyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology*. 2002; 148:3681–93. DOI: 10.1099/00221287-148-11-3681.
17. Sizova Ya.V., Pisanov R.V., Vodopyanov A.S., Cherepakina I.Ya., Burlakova O.S. [Phenotypic and genotypic analysis of toxin production of typical and atypical strains of *Vibrio cholerae* in stress environmental conditions]. *Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya [Modern Problems of Science and Education]*. 2017; 3. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=26439>.
18. Watnick P.I., Fullner K.J., Kolter R.A. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* 1999; 181:3606–9. DOI: 10.1128/JB.181.11.3606-3609.1999.
19. Chiavelli D.A., Marsh J.W., Taylor R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(7):719–27. DOI: 10.1128/AEM.67.7.3220-3225.2001.

Authors:

Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Gaevskaya N.E., Vodopyanov A.S., Nepomnyashchaya N.B. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторах:

Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-97-105

УДК 616.36-002+616.98:578.828НIV

Ю.В. Останкова¹, Д.Э. Валутите¹, Е.Б. Зуева¹, Е.Н. Серикова¹, А.Н. Щемелев¹, S. Boumbaly^{4,5},
T.A.L. Balde⁴, A.B. Семенов^{1, 2, 3}

ПЕРВИЧНЫЕ МУТАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ПАЦИЕНТОВ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННОЙ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

¹ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ²ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ³ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ⁴Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика; ⁵Международный исследовательский центр по тропическим инфекциям в Гвинее, Гвинейская Республика

Цель. Оценка распространенности первичных мутаций лекарственной устойчивости ВГС в гене NS5b у пациентов с впервые выявленной инфекцией ВИЧ. **Материалы и методы.** Материалом исследования служили 196 образцов плазмы крови пациентов, проживающих на территории СЗФО, с впервые выявленным ВИЧ. Образцы обследовали на наличие антител анти-HCV и РНК ВГС. В случае выявления РНК ВГС осуществляли амплификацию с использованием трех пар праймеров, совместно фланкирующих ген NS5b. После секвенирования нуклеотидной последовательности указанного гена определяли субтип вируса и выявляли мутации лекарственной устойчивости. **Результаты и обсуждение.** Антитела к ВГС выявлены у 18,87 % ВИЧ-инфицированных лиц, РНК ВГС – у 18,36 % пациентов, включая 89,18 % анти-ВГС-позитивных и 1,88 % анти-ВГС-негативных больных. Показано, что ко-инфекция чаще встречается у мужчин (77,8 %), чем у женщин (22,2 %). Выявлено отличие по вирусной нагрузке ВИЧ между группами с моноинфекцией ВИЧ и с ко-инфекцией ВИЧ + ВГС, показано достоверное отличие групп по количеству CD4+ лимфоцитов. При филогенетическом анализе субтипы ВГС распределены следующим образом: ВГС 1b – 47,2 %, ВГС 3a – 30,6 %, ВГС 1a – 13,9 %, ВГС 2a – 5,5 % и единственный образец определен как ВГС 2k – 2,8 %. В девяти образцах (25 %) обнаружены мутации NS5b в положениях, связанных с развитием лекарственной устойчивости ВГС, в том числе по два образца среди ВГС генотипов 1a и 3a, а также пять образцов среди ВГС 1b. Мутации среди ВГС 1a представляли собой замены C316Y и N444D, среди ВГС 1b выявлены замены C316N, C451S, S556N/G. У пациентов с ВГС 3a выявлены два образца с мутацией D310N, ассоциированной с неблагоприятным прогнозом заболевания. Полученные данные рационально использовать для оценки динамики распространенности первичной фармакорезистентности ВГС среди ВИЧ-инфицированных лиц.

Ключевые слова: вирус гепатита С, ко-инфекция ВИЧ + ВГС, мутации лекарственной устойчивости, первичные мутации устойчивости, терапевтически наивные пациенты, секвенирование.

Корреспондирующий автор: Останкова Юлия Владимировна, e-mail: shenna1@yandex.ru.

Для цитирования: Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Boumbaly S., Balde T.A.L., Семенов А.В. Первичные мутации лекарственной устойчивости вируса гепатита С у пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:97–105. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-97-105

Поступила 02.06.20. Принята к публ. 23.06.20.

Yu.V. Ostankova¹, D.E. Valutite¹, E.B. Zueva¹, E.N. Serikova¹, A.N. Shchemelev¹, S. Boumbaly^{4,5},
T.A.L. Balde⁴, A.V. Semenov^{1,2,3}

Primary HCV Drug Resistance Mutations in Patients with Newly Diagnosed HIV Infection

¹Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russian Federation;

²Saint-Petersburg State Medical University n.a. acad. I. P. Pavlov, Saint Petersburg, Russian Federation;

³North-Western State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russian Federation;

⁴Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea;

⁵Centre International de Recherche sur les Infections Tropicales en Guinée/International Research Center on Tropical Infections in the Republic of Guinea, Republic of Guinea

Abstract. Objective of our work was to assess prevalence of the primary HCV drug resistance mutations in the NS5b gene in patients with newly diagnosed HIV infection. **Materials and methods.** The study material was 196 blood plasma samples from patients living in the North-Western Federal District with newly diagnosed HIV. Samples were examined for the anti-HCV antibodies and HCV RNA presence. If HCV RNA was detected, amplification was performed using three primers pairs that co-flanked the NS5b gene. After sequencing the indicated gene nucleotide sequence, the virus subtype was determined and drug resistance mutations were detected. **Results and discussion.** Antibodies to HCV were detected in 18.87 % of HIV-infected individuals. HCV RNA was detected in 18.36 % of the patients, including 89.18 % anti-HCV-positive and 1.88 % anti-HCV-negative. It was shown that co-infection is more common in men (77.8 %) compared to women (22.2 %) – $\chi^2 = 3.996$ at $p = 0.0456$, $df = 2$. The difference in the HIV viral load between the groups with HIV monoinfection and with HIV + HCV coinfection was demonstrated ($\chi^2 = 6.284$ at $p = 0.0432$, $df = 2$). A significant difference between the groups by the CD4 + lymphocytes number was shown. In the phylogenetic analysis, the HCV subtypes are distributed as follows: HCV 1b – 47.2 %, HCV 3a – 30.6 %, HCV 1a – 13.9 %, HCV 2a – 5.5 % and only one sample was defined as HCV 2k – 2.8 %, respectively. Nine samples (25 %) presented NS5b mutations in

the positions related to the development of drug resistance of HCV, including two samples among HCV genotypes 1a and 3a (i.e., 5.6 % of the total HIV + HCV group), as well as five samples among HCV 1b (13.9 % of the total group). Mutations among HCV 1a were C316Y and N444D substitutions. Among HCV 1b, C316N, C451S, S556N/G substitutions were identified. Among patients with HCV 3a, 2 samples (5.6 %) with a D310N mutation associated with an unfavorable disease prognosis were found. The introduction of direct sequencing of HCV nucleotide sequences into the routine laboratory diagnostics will allow us to estimate the primary drug resistance mutations prevalence in risk groups to predict the HCV life-threatening complications development – fibrosis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma, as well as the outcome of antiviral therapy prognosis. The data obtained can be rationally used to assess the dynamics of the HCV primary pharmacoresistance prevalence among HIV-infected individuals.

Key words: Hepatitis C virus, coinfection with HIV + HCV, drug resistance mutations, primary resistance mutations, treatment naive patients, sequencing.

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

Corresponding author: Yulia V. Ostankova, e-mail: shenna1@yandex.ru.

Citation: Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Zueva E.B., Serikova E.N., Shchemelev A.N., Boumbaly S., Balde T.A.L., Semenov A.V. Primary HCV Drug Resistance Mutations in Patients with Newly Diagnosed HIV Infection. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:97–105. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-97-105

Received 02.06.20. Accepted 23.06.20.

Ostankova Yu.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Valutite D.E., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0931-102X>

Zueva E.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Serikova E.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>

Schemelev A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Semenov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Согласно данным ВОЗ, распространенность вируса гепатита С (ВГС) в мире составляет примерно 2,8 %, затрагивая более 185 млн человек, в связи с чем ВГС остается одной из глобальных проблем здравоохранения [1].

ВГС приводит как к острым, так и хроническим заболеваниям печени, при острой стадии инфекции большинство людей не испытывают никаких симптомов [2]. В течение 6 месяцев после заражения 15–45 % инфицированных могут спонтанно выздороветь без какого-либо лечения, в то время как у 55–85 % разовьется хронический вирусный гепатит С (ХВГС) с персистирующей инфекцией, связанный с развитием цирроза печени, гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), печеночной недостаточности [2].

ВГС классифицирован на восемь генотипов по составу нуклеотидных последовательностей, отличающихся друг от друга на 31–33 %, генотипы 1–4 и 6–7 подразделяют, в свою очередь, на переменное число генетически более близких субгенотипов, отличающихся друг от друга на 20–25 % (в настоящее время описано более 100 субгенотипов) [3]. Наиболее распространенным в мире генотипом является ВГС 1 (46 %), за которым следуют генотипы 3 (22 %), 2 (13 %) и 4 (13 %) [4]. При этом, хотя генотипы 1, 2 и 3 представлены во всем мире, их относительная распространенность варьирует в зависимости от географического района. Так, 1a и 1b являются наиболее распространенными в Европе, США, Японии, ВГС 3a – в Индии, Непале и Пакистане, ВГС 4 преобладает на Ближнем Востоке и в Северной Африке, генотипы 5 и 6, по-видимому, наиболее распространены в Южной Африке и Гонконге соответственно, генотип 7 – в Африке, генотип 8 – в Индии [3]. Несмотря на то, что большинство инфекций ВГС в мире относятся к вариантам 1 и 3, встречаемость более редких генотипов в тех или иных регионах может быстро увеличиваться, если они оказываются

связаны с эффективными путями передачи, так как в определении глобальной распространенности разных типов вируса социальные, поведенческие и демографические факторы, включая международную миграцию, являются более важными, чем генетические вариации вируса [5]. В Российской Федерации (РФ) преобладают субгенотипы 1b и 3a, циркулирующие в различных соотношениях в регионах страны, затем следуют ВГС 1a и 2 [6].

Прогрессирование заболеваний печени, связанных с ВГС, можно предотвратить путем длительного подавления вирусной репликации эффективными лекарственными средствами. Длительное время лечение ХВГС было основано на комбинации пегилированного интерферона альфа и рибавирина (PegIFN / RBV), однако этот способ отягощен серьезными побочными реакциями как минимум у 10 % пациентов, а устойчивый вирусологический ответ достигается только у 50 % инфицированных генотипом 1 и 4. Революцией в терапии ХВГС стала разработка препаратов прямого противовирусного действия (ПППД), направленных на ключевые белки вируса: протеазу NS3, полимеразу NS5B и белок NS5A. Схемы, сочетающие комбинации препаратов, нацеленных на разные мишени, приводят к увеличению частоты устойчивого вирусологического ответа до уровня выше 90 % и сокращают продолжительность лечения до 12 недель и менее [7].

В 2016 г. ВОЗ предложила глобальную стратегию по ликвидации вирусных гепатитов к 2030 г. В отношении ВГС целью этой работы является снижение числа случаев заболевания на 90 %, повышение безопасности медицинских процедур, сокращение смертности на 65 %, увеличение доли людей, которым осуществлена диагностика инфекции, до 90 % и доли вылеченных – до 80 % [8].

Поскольку в настоящее время продолжительность лечения, показатели излечения и необходи-

мость применения специфических ПППД, а также интерферона и рибавирина частично зависит от генотипа и субтипа ВГС, разработка национальных стратегий лечения требует детального понимания относительной распространенности геновариантов ВГС в стране. Еще одной проблемой является продолжающаяся передача ВГС среди населения в группах высокого риска. Относительная величина частоты передачи вируса внутри страны и за рубежом может быть ключевым параметром для оценки успеха отдельных национальных стратегий лечения. Национальные программы по элиминации и профилактике могут быть успешными только в том случае, если значительная часть заражений происходит внутри страны, в то время как международная координация становится более важной при повышении частоты трансграничной передачи вируса. Исследователи в Швейцарии показали, что, хотя передача возбудителя между странами сохраняется, внутренняя передача со временем приобретает большее значение, то есть диагностический скрининг с особым акцентом на группы высокого риска может стать значимым шагом в национальной стратегии по ликвидации ВГС и должен рассматриваться в качестве одного из главных приоритетов [9]. Косвенные данные свидетельствуют о важной роли передачи ВГС внутри страны среди ВИЧ-инфицированных лиц: пациенты, у которых ВИЧ генетически близок с таковым у пациентов с ко-инфекцией ВИЧ + ВГС, имеют более высокий риск заражения ВГС. Это также указывает на высокую частоту передачи ВГС в семейных/партнерских очагах данного контингента и позволяет выявить лиц с высоким риском инфицирования ВГС [10]. В отсутствие вакцинации для предотвращения инфекции и повторного заражения ВГС важным элементом стратегий элиминации вируса является лечение людей с высоким риском передачи его другим. Исходя из вышесказанного, люди, живущие с ВИЧ-инфекцией (ЛЖВ), определены как группа, в которой микроэлиминация ВГС представляется возможной, потому что такие больные с большей вероятностью будут выявлены и имеют больший доступ к ПППД ВГС, чем другие группы населения [11]. В то же время ко-инфекция ВИЧ + ВГС вызывает особую озабоченность еще и потому, что скорость прогрессирования заболевания печени в этой популяции более высока и фактически является одной из наиболее распространенных причин смерти среди ВИЧ-инфицированных лиц, получающих антиретровирусную терапию (АРВТ), и в целом смертность при ко-инфекции ВИЧ + ВГС выше, чем при моноинфекциях ВГС или ВИЧ [12]. Причем вирусная нагрузка ВИЧ является независимым предиктором прогрессирования фиброза печени у этих пациентов.

Однако высокая скорость репликации ВГС и отсутствие механизма коррекции мутационных замен определяют естественную изменчивость, способствующую быстрому появлению устойчивых к ле-

карствам геновариантов [13]. Генотип ВГС, субтип и наличие ассоциированных с фармакорезистентностью мутаций являются ключевыми детерминантами выбора режимов лечения ПППД, в связи с чем неверное определение генотипа и несвоевременное выявление мутаций лекарственной устойчивости могут привести к неоптимальным схемам лечения, неудачному исходу терапии, если используются не пангенотипические схемы [14]. В связи с этим особое значение приобретает определение генотипов, субтипов и мутаций ВГС в значимых для распространения вируса внутри страны группах риска, в том числе и среди ВИЧ-инфицированных лиц. В контексте многих новых ПППД важно получить популяционные данные об изменениях лекарственной устойчивости ВГС среди не получавших лечение лиц, чтобы выявить мутации, которые влияют на результат терапии.

Целью нашей работы стала оценка распространенности первичных мутаций лекарственной устойчивости ВГС в гене NS5b у пациентов с впервые выявленной инфекцией ВИЧ.

Материалы и методы

Исследование одобрено комитетом по этике ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (Санкт-Петербург). В работе использована плазма крови 196 пациентов, проживающих на территории Северо-Западного федерального округа, с впервые выявленным ВИЧ.

Образцы обследовали на наличие антител анти-HCV и РНК ВГС.

Экстракцию РНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции. Для выявления ВГС анализ присутствия вируса проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с помощью коммерческого набора «АмплиСенс HCV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Вирусную нагрузку ВГС и ВИЧ определяли с использованием коммерческих наборов производства ФБУН ЦНИИЭ (Москва) «АмплиСенс HCV-Монитор-FL» и «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT» соответственно, согласно инструкциям производителя.

Обратную транскрипцию проводили на неспецифичных праймерах с использованием коммерческого набора реагентов «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва) для синтеза первой цепи кДНК, согласно инструкции производителя. Реакцию останавливали нагреванием в течение 5 мин при температуре 70 °С. Далее осуществляли амплификацию с использованием трех пар праймеров, совместно фланкирующих ген NS5b ВГС.

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 3–30 пМ каждого олигопраймера, 0,8–1,0 мМ каждого дезок-

синуклеотида, 5,8 мМ $MgCl_2$, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, США), буфер для Taq ДНК-полимеразы, 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл. Амплификацию в общем виде проводили при следующих условиях: после денатурации при температуре 95 °С в течение 15 мин устанавливали 30–40 циклов в режиме: 95 °С – 20 сек, 52–58 °С – 20–30 сек, 72 °С – 120 сек; затем финальная элонгация при температуре 72 °С – 5 мин. Качество ПЦР определяли визуальным методом электрофореза в 2 % агарозном геле (120 В, 40 мин; 1хTBE), окрашенном бромидом этидия.

Для последующего исследования использовали специфичные праймеры. Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США) в трех повторях, на прямых и обратных праймерах. Пробы исследовали с помощью генетического анализатора ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США).

Типирование ВГС осуществляли на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена NS5b. Первичный анализ проводили с помощью программы NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA v.7.0, используя алгоритм ClustalW [15]. Для последующего филогенетического анализа применяли метод Maximum Likelihood, позволяющий провести оптимизацию деревьев в соответствии с моделью General Time Reversible и Gamma Distributed (GTR + G), при оценке достоверности генетических связей использовали многократную генерацию выборок методом Монте-Карло (bootstrap) для 1000 независимых построений каждого филогенетического древа. Графическое изображение нуклеотидной и аминокислотной последовательностей полного генома ВГС относительно референсного образа H77 получали с помощью online программы Sequence locator в базе данных ВГС (<https://hcv.lanl.gov/content/sequence/LOCATE/locate.html>). Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета программ MS Excel, Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. В качестве порога достоверности отличий определено значение вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Возраст пациентов в группе варьировал от 18 до 65 лет и составил в среднем $(36,5 \pm 14,7)$ лет. Количество мужчин преобладало по сравнению с женщинами – 63,3 и 36,7 % соответственно.

В нашем исследовании антитела к ВГС выявлены у 18,87 % ВИЧ-инфицированных лиц. При использовании коммерческого набора «АмплиСенс® HCV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва) РНК ВГС выявили у 18,36 % пациентов, включая 89,18 % анти-ВГС-позитивных и 1,88 % анти-ВГС-негативных больных. Таким образом, среди РНК ВГС-позитивных пациентов 8,3 % были серонегативны. Выявление РНК ВГС у пациентов без анти-HCV, по всей видимости, связано с тем, что при диагностике острой инфекции ВГС у пациентов с ВИЧ-инфекцией серологические маркеры могут не определяться [16]. При анализе выявления ВГС среди ВИЧ-инфицированных лиц в зависимости от пола показано, что ко-инфекция чаще встречается у мужчин (77,8 %) по сравнению с женщинами (22,2 %): $\chi^2=3,996$ при $p=0,0456$, $df=2$.

Вирусная нагрузка ВГС среди анти-HCV-негативных пациентов составила в среднем $1,9 \cdot 10^4$ МЕ/мл, в то время как среди анти-HCV-позитивных больных – $6,4 \cdot 10^6$ МЕ/мл. При оценке вирусной нагрузки среди больных с моноинфекцией и с ко-инфекцией показано, что она составляет в среднем $4,4 \log_{10}$ и $4,6 \log_{10}$ копий/мл соответственно. При этом среди пациентов с моноинфекцией 54,4 % обследуемых имели вирусную нагрузку менее $4 \log_{10}$ копий/мл, 29,4 % – больше 4 и меньше $5 \log_{10}$ копий/мл, 16,2 % – более $5 \log_{10}$ копий/мл. В группе пациентов с ко-инфекцией распределение по вирусной нагрузке представлено таким образом: 50, 16,7 и 33,3 % соответственно. Таким образом, распределение вирусной нагрузки ВИЧ в группе с ко-инфекцией достоверно отличалось от группы с моноинфекцией ВИЧ ($\chi^2=6,284$ при $p=0,0432$, $df=2$).

При анализе количества CD4+ лимфоцитов показано, что в группе с моноинфекцией ВИЧ 5,6 % пациентов с CD4+ <200 клеток/мкл, 35 % с 200–400 клеток/мкл, 59,4 % с >400 клеток/мкл. В группе с ко-инфекцией ВИЧ + ВГС распределение было следующим: 11,1, 55,6 и 33,3 % пациентов соответственно. Показано достоверное отличие групп: $\chi^2=8,187$ при $p=0,0167$, $df=2$.

Для 36 образцов удалось получить нуклеотидные последовательности гена NS5b. При филогенетическом анализе показано преобладание генотипа 1 (61,1 %) по сравнению с генотипами 3 (30,6 %) и 2 (8,3 %). Субтипы ВГС распределены следующим образом: ВГС 1b оказался наиболее распространенным вариантом вируса в обследуемой группе и составил 47,2 %, затем следует ВГС 3a – 30,6 %, ВГС 1a – 13,9 %, ВГС 2a – 5,5 % и единственный образец определен как ВГС 2k – 2,8 %. Филогенетические отношения между исследованными образцами ВГС и референсными штаммами из международной базы данных GenBank представлены на рис. 1.

Мы не выявили ассоциации вирусной нагрузки ВГС, ВИЧ, а также количества CD4+ лимфоцитов с генотипами ВГС.

Хотя в целом ген NS5b умеренно консервативен, домен ладони (от 188 до 227 и от 287 до 370) счи-

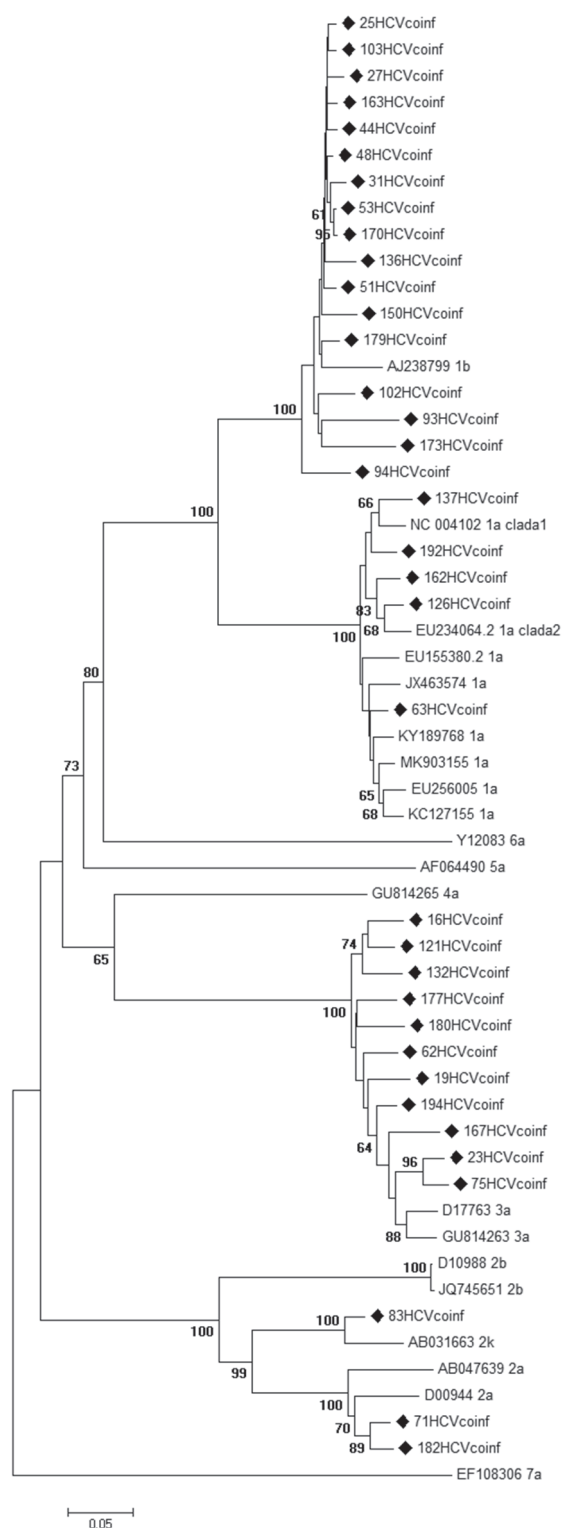


Fig. 1. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of NS5b gene of HCV isolated from patients with newly identified HIV infection, residing in NWFD. References sequences are marked with GenBank codes with indication of sample genotype. The diamonds label the samples studied within the frames of this work. Presented are the values with bootstrap ≥ 60

В исследованной нами группе в девяти образцах (25 %) обнаружены мутации NS5b в положениях, связанных с развитием лекарственной устойчивости ВГС. Так, мы выявили по два образца с фармакорезистентными мутациями среди ВГС генотипов 1a и 3a (то есть по 5,6 % от общей группы ВИЧ + ВГС), а также пять образцов среди ВГС 1b (13,9 % от общей группы). Мутации среди ВГС 1a представляли собой замену цистеина на тирозин в положении 316 (C316Y), способную ослаблять противовирусную эффективность некоторых ненуклеозидных ингибиторов, например дасабувира. В одном из этих образцов также показана мутация N444D. Отметим также, что при филогенетическом анализе четыре образца ВГС 1a подразделялись на клады 1 и 2, связанные с

частотой естественных мутаций фармакорезистентности: для клады 1 показана устойчивость к симепревиру, но не к паритапревиру, а для клады 2 характерна перекрестная устойчивость к симепревиру и паритапревиру [21].

Фармакорезистентная мутация в положении 316 (замена C316N) показана и среди ВГС 1b, в одном образце одновременно присутствовала мутация S556N. Еще в одном образце выявили мутации фармакорезистентности C451S и S556G. Отметим, что замена C316N является одной из самых распространенных фармакорезистентных мутаций ВГС 1b среди пациентов, не получавшихПППД в Азии, а также на территории бывшего СССР [22].

Таким образом, мутации лекарственной устойчивости чаще встречаются среди ВГС 1b, однако их более высокая распространенность обусловлена присутствием замены C316N, обеспечивающей низкий уровень устойчивости к тегобувиру и HCV-796 у штаммов генотипа 1b.

Как известно, в модели нейтральной эволюции зависящее от стохастических факторов распространение нейтральных мутаций может приводить к фиксации даже неблагоприятных изменений генома, если вирус циркулирует в сравнительно небольшой популяции, например в среде потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) или в других группах риска [23]. Сочетание высокой скорости репликации ВГС, низкой точности вирусной полимеразы, селективного давления со стороны иммунной системы и медикаментозного лечения приводят к развитию вирусных квазидисперсных популяций с высоким разнообразием нуклеотидных последовательностей, потенциально способных накапливать варианты вируса с мутациями лекарственной устойчивости кПППД даже в отсутствии терапии. В процессе негативного отбора исключаются неблагоприятные изменения, однако благоприятные, например способствующие репликации, приводят к конкурированию таких вариантов вируса в динамичном процессе непрерывного положительного отбора. И даже несмотря на то, что нуклеотидная последовательность преобладающего в квазидисперсной популяции ВГС в организме одного хозяина может быть близка к максимальной репликационной способности вируса, существование большой и разнообразной вирусной популяции допускает быстрые адаптивные модификации в ответ

на внешние изменения. Это, в свою очередь, может приводить к появлению фармакорезистентных мутаций вируса до лечения и практически мгновенному приспособлению, то есть отсутствию вирусологического ответа, при начале терапии [24]. В проведенном исследовании в США мутации устойчивости кПППД обнаруживали у пациентов, не получавших терапии, независимо от генотипа вируса, в основном они были с низким уровнем резистентности, за исключением единичных случаев, причем встречаемость образцов с такими мутациями одновременно в генах NS5b и NS5a была ниже при генотипе 1a по сравнению с ВГС 1b [24]. Исследование распространенности устойчивых к лекарственным средствам мутаций среди терапевтически-наивных больных ХВГС в Японии также продемонстрировали встречаемость фармакорезистентных штаммов ВГС 1b и сравнительную редкость появления значимых замен более чем в одном регионе вируса [25].

В связи с вышесказанным особый интерес вызвал образец генотипа 1b с мутациями C451S и S556G в NS5b-регионе. Мы секвенировали и проанализировали полный геном ВГС данного образца. Графическое изображение его нуклеотидной и аминокислотной последовательностей, выполненное с использованием on-line программы Sequence locator в базе данных ВГС <https://hcv.lanl.gov/content/sequence/LOCATE/locate.html>, представлено на рис. 2.

Нуклеотидные последовательности генов, на которые направлено действиеПППД, продемонстрировали высокую гетерогенность в позициях, потенциально связанных с лекарственной устойчивостью вируса. Замены, выявленные в генах NS3, NS5a, NS5b, представлены в таблице.

Мутация V170I в NS3-регионе ассоциирована с устойчивостью к газопревиру, боцепревиру, симепревиру, телапревиру, воксилапревиру. Естественные полиморфные варианты NS3, связанные со снижением лекарственной чувствительности, ранее наблюдались у терапевтически-наивных пациентов, причем, несмотря на то, что устойчивые вирусные штаммы у таких больных присутствуют в очень ограниченном количестве, специфические мутации протеазы NS3 могут играть важную роль в модулировании развития резистентности и изменении вирусной адаптивности [26].

Мутация P58L в NS5a-регионе ассоциирована с

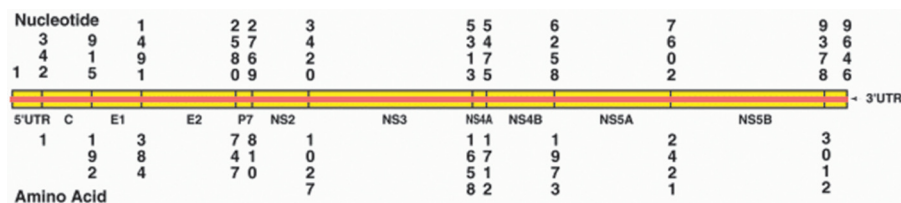


Рис. 2. Графическое изображение нуклеотидной и аминокислотной последовательностей полного генома ВГС образца 150HCVcoinf (HCV_NWFD_1cg_coinf18). Обозначены структурные элементы генома, представлены нуклеотидные и соответствующие аминокислотные позиции

Fig. 2 Graphical image of nucleotide and amino acid sequences of complete HCV genome of 150HCVcoinf (HCV_NWFD_1cg_coinf18) sample. Structural elements of the genome are indicated, nucleotide and corresponding amino acid positions are presented

Мутации, выявленные в регионах NS3, NS5a, NS5b ВГС образца 150HCVcoinf (HCV_NWFD_1cg_coinf18).

Mutations identified in NS3, NS5a, NS5b regions of HCV of 150HCVcoinf (HCV_NWFD_1cg_coinf18) sample

Ген Gene	Мутация Mutation
NS3	A66G, T72I, P86Q, K87A, L94M, F147S, V170I
NS5a	K6R, S17T, L34I, P58L, I63M, T64A, H85Y, T87S, R108K, E117D, V164A, E171D, V174S, Q181H, L183P
NS5b	M57L, R65Q, M71I, Q90K, V116T, Q127L, A218S, I262V, V338A, P356A, L362R, H374Y, T377S, G378N, L419F, C451S, E455D, Q464H, A513S, K523S, S549G, S556G

устойчивостью к даклтасвиру, а также, предположительно, может быть связана с резистентностью к ледипасвиру [27].

Как уже сказано выше, изменения генов C451S и S556G в NS5b-регионе становятся причиной устойчивости ВГС к дасабувиру, делеобувиру и JTK-109, при этом непосредственно мутацией устойчивости является хорошо охарактеризованная ранее замена S556G, в то время как C451S лишь снижает чувствительность. Отметим также замену L419F, не описанную как фармакорезистентная, однако мутация L419M/S в этой позиции демонстрирует устойчивость к тегобувиру и HCV796. Отметим, что, хотя для мутации NS5b S556G показана частая сочетаемость с мутациями NS5b L159F или M414I/T, в нашем образце такого сочетания не выявлено [22].

Помимо замен в традиционно анализируемых для выявления мутаций лекарственной устойчивости генах, мы обнаружили изменения L91M в гене Core, которые при ВГС генотипа 1b не только могут влиять на ответ на интерферон, но и связаны с развитием гепатоцеллюлярной карциномы, причем в России эта мутация широко распространена [28].

Нуклеотидная последовательность полного генома изолята ВГС 150HCVcoinf (HCV_NWFD_1cg_coinf18) депонирована в международную базу данных GenBank под номером MT512570.

Остается неясным вопрос, являются ли выявленные нами мутации лекарственной устойчивости ВГС у лиц с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией результатом естественного полиморфизма вируса или следствием передачи от принимавших ПППД пациентов, особенно с учетом того, что ко-инфекция ВИЧ + ВГС широко распространена среди ПИН в Санкт-Петербурге [29]. Случаи обнаружения у пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией РНК ВГС в отсутствии антител анти-НСV, а также первичных мутаций лекарственной устойчивости ВГС заслуживают дальнейшего изучения с целью определения путей инфицирования, оценки распространенности мутаций в настоящее время и в динамике в группах риска при моно- и ко-инфекции при серопозитивном и серонегативном ВГС в Российской Федерации. Создание базы данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей штаммов ви-

руса гепатита С, их характеристик вкупе с анамнестическими сведениями о пациентах, данными о наличии/отсутствии антител, а также ответом на применяемую терапию, как, например, было предложено для бактериальных и вирусных инфекций I–II групп патогенности, могло бы способствовать решению этих задач, что в дальнейшем может играть роль при разработке и подборе новых методов лечения [30].

В обследованной нами группе людей РНК вируса гепатита С показана у 18,36 % пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией, причем каждый четвертый из них имеет мутации лекарственной устойчивости ВГС в гене NS5b. При анализе полногеномной последовательности ВГС с мутациями в этом регионе мы выявили значимые фармакорезистентные замены в других регионах генома вируса. Принимая во внимание распространенность ВГС у ВИЧ-инфицированных пациентов, а также распространение первичных мутаций лекарственной устойчивости ВГС, своевременное обнаружение коинфекции у пациентов с ВИЧ и определение мутаций позволят выбрать оптимальную терапию. При этом в алгоритм обследования не получавших терапии ВГС-инфицированных лиц необходимо включать анализ полного генома вируса или, по крайней мере, анализ трех генов, на которые нацелены препараты прямого противовирусного действия (NS3, NS5a, NS5b).

Молекулярно-генетическая характеристика последовательностей ВГС будет способствовать последующей идентификации путей передачи патогена с целью контроля и/или предотвращения распространения инфекции. Полученные данные рационально использовать для оценки динамики распространенности первичной фармакорезистентности ВГС среди ВИЧ-инфицированных лиц.

Авторы подтверждают, что от всех участников исследования получено информированное согласие.

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

Список литературы

1. Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22(34):7824–40. DOI: 10.3748/wjg.v22.i34.7824.
2. Мукомолов С.Л., Левакова И.А. Эпидемиологическая характеристика хронических вирусных гепатитов в Российской Федерации в 1999–2009 гг. *Инфекция и иммунитет.* 2011; 1(3):255–62. DOI: 10.15789/2220-7619-2011-3-255-262.
3. Borgia S.M., Hedskog C., Parhy B., Hyland R.H., Stamm L.M., Brainard D.M., Subramanian M.G., McHutchison J.G., Mo H., Svarovskaia E., Shaffran S.D. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C Virus into 8 genotypes. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(11):1722–9. DOI: 10.1093/infdis/jiy401.
4. Gower E., Estes C., Blach S., Razavi-Shearer K., Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 2014; 61(1):S45–57. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.07.027.
5. Messina J.P., Humphreys I., Flaxman A., Brown A., Cooke G.S., Pybus O.G., Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2015; 61(1):77–87. DOI: 10.1002/hep.27259.

6. Соболева Н.В., Карлсен А.А., Кожанова Т.В., Кичатова В.С., Клущкина В.В., Исаева О.В., Игнатова М.Е., Романенко В.В., Ооржак Н.Д., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Распространенность вируса гепатита С среди условно здорового населения Российской Федерации. *Журнал инфектологии*. 2017; 9(2):56–64. DOI: 10.22625/2072-6732-2017-9-2-56-64.
7. Asselah T., Boyer N., Saadoun D., Martinot-Peignoux M., Marcellin P. Direct-acting antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection: optimizing current IFN-free treatment and future perspectives. *Liver Int.* 2016; 36(1):47–57. DOI: 10.1111/liv.13027.
8. World Health Organization. Global health sector strategy on viral hepatitis, 2016–2021: towards ending viral hepatitis. 2016. [Электронный ресурс]. URL: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246177/1/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf> (дата обращения 11.05.20).
9. Salazar-Vizcaya L., Kouyos R.D., Metzner K.J., Caraballo Cortes K., Böni J., Shah C., Fehr J., Braun D.L., Bernasconi E., Mbunkah H.A., Hoffmann M., Labhardt N., Cavassini M., Rougemont M., Günthard H.F., Keiser O., Rauch A. Swiss HIV cohort study. Changing trends in international versus domestic HCV transmission in HIV-positive men who have sex with men: a perspective for the direct-acting antiviral scale-up era. *J. Infect. Dis.* 2019; 220(1):91–9. DOI: 10.1093/infdis/jiz069.
10. Kouyos R.D., Rauch A., Böni J., Yerly S., Shah C., Aubert V., Klimkait T., Kovari H., Calmy A., Cavassini M., Battegay M., Vernazza P.L., Bernasconi E., Ledergerber B., Günthard H.F. Swiss HIV cohort study (SHCS). Clustering of HCV coinfections on HIV phylogeny indicates domestic and sexual transmission of HCV. *Int. J. Epidemiol.* 2014; 43(3):887–96. DOI: 10.1093/ije/dyt276.
11. Martin N.K., Boerekamp A., Hill A.M., Rijnders B.J.A. Is hepatitis C virus elimination possible among people living with HIV and what will it take to achieve it? *J. Int. AIDS Soc.* 2018; 2:e25062. DOI: 10.1002/jia2.25062.
12. Thornton A.C., Jose S., Bhegani S., Chadwick D., Dunn D., Gilson R., Main J., Nelson M., Rodger A., Taylor C., Youssef E., Leen C., Gompels M., Kegg S., Schwenk A., Sabin C. UK Collaborative HIV cohort (UK CHIC) steering committee. Hepatitis B, Hepatitis C, and mortality among HIV-positive individuals. *AIDS*. 2017; 31(18):2525–32. DOI: 10.1097/QAD.0000000000001646.
13. Thompson A.J., McHutchison J.G. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). *J. Viral. Hepat.* 2009; 16:377–87. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2009.01124.x.
14. Welzel T.M., Bhardwaj N., Hedskog C., Chodavarapu K., Camus G., McNally J., Brainard D., Miller M.D., Mo H., Svarovskaia E., Jacobson I., Zeuzem S., Agarwal K. Global epidemiology of HCV subtypes and resistance-associated substitutions evaluated by sequencing-based subtype analyses. *J. Hepatol.* 2017; 67(2):224–36. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.03.014.
15. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7):1870–4. DOI: 10.1093/molbev/msw054.5.
16. Chamie G., Bonacini M., Bangsberg D.R., Stapleton J.T., Hall C., Overton E.T., Scherzer R., Tien P.C. Factors associated with seronegative chronic hepatitis C virus infection in HIV infection. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 44:577–83. DOI: 10.1086/511038.
17. Gul A., Ali I., Gul N., Ahmed J. Amino acid mutations in NS5B protein among treatment-naïve genotype 3a infected patients. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* 2019; 29(12):1149–52.
18. Asahina Y., Izumi N., Enomoto N., Uchiyama M., Kurosaki M., Onuki Y., Nishimura Y., Ueda K., Tsuchiya K., Nakanishi H., Kitamura T., Miyake S. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2005; 43(4):623–29. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.05.032.
19. Wyles D.L., Luetkemeyer A.F. Understanding hepatitis C virus drug resistance: clinical implications for current and future regimens. *Top. Antivir. Med.* 2017; 25(3):103–9.
20. Nelson D.R., Cooper J.N., Lalezari J.P., Lawitz E., Pockros P.J., Gitlin N. All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology*. 2015; 61(4):1127–35. DOI: 10.1002/hep.27726.
21. Bagaglio S., Uberti-Foppa C., Messina E., Merli M., Hasson H., Andolina A., Galli A., Lazzarin A., Morsica G. Distribution of natural resistance to NS3 protease inhibitors in hepatitis C genotype 1a separated into clades 1 and 2 and in genotype 1b of HIV-infected patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 2016; 22(4):386.e1–3. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.12.007.
22. Wu R., Geng D., Chi X., Wang X., Gao X., Xu H., Shi Y., Guan Y., Wang Y., Jin J., Ding Y., Niu J. Computational analysis of naturally occurring resistance-associated substitutions in genes NS3, NS5A, and NS5B among 86 subtypes of hepatitis C virus worldwide. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12:2987–3015. DOI: 10.2147/IDR.S218584.
23. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(11):3173–88. DOI: 10.1099/vir.0.80401-0.
24. Paolucci S., Fiorina L., Mariani B., Gulminetti R., Novati S., Barbarini G., Bruno R., Baldanti F. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virology*. 2013; 10:355. DOI: 10.1186/1743-422X-10-355.
25. Suzuki F., Sezaki H., Akuta N., Suzuki Y., Seko Y., Kawamura Y., Hosaka T., Kobayashi M., Saito S., Arase Y., Ikeda K., Kobayashi M., Mineta R., Watahiki S., Miyakawa Y., Kumada H. Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *J. Clin. Virol.* 2012; 54(4):352–4. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.04.024.
26. Welsch C., Schweizer S., Shimakami T., Domingues F.S., Kim S., Lemon S.M., Antes I. Ketoamide resistance and hepatitis C virus fitness in val55 variants of the NS3 serine protease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56:1907–15. DOI: 10.1128/AAC.05184-11.
27. Fridell R.A., Wang C., Sun J.H., O’Boyle D.R., Nower P., Valera L., Qiu D., Roberts S., Huang X., Kienzie B., Bifano M., Nettles R.E., Gao M. Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor BMS-790052 in humans: in vitro and in vivo correlations. *Hepatology*. 2011; 54(6):1924–35. DOI: 10.1002/hep.24594.
28. Kichatova V.S., Kyuregyan K.K., Soboлева N.V., Karlson A.A., Isaeva O.V., Isagulians M.G., Mikhailov M.I. Frequency of interferon-resistance conferring substitutions in amino acid positions 70 and 91 of core protein of the Russian HCV 1b isolates analyzed in the T-cell epitope context. *J. Immunol. Res.* 2018; 7:7685371. DOI: 10.1155/2018/7685371.
29. Tsui J.I., Ko S.C., Krupitsky E., Lioznov D., Chaisson C.E., Gnatienco N., Samet J.H. Insights on the Russian HCV Care Cascade: Minimal HCV Treatment for HIV/HCV co-infected PWID in St. Petersburg. Version 2. *Hepatol. Med. Policy*. 2016; 1:13. DOI: 10.1186/s41124-016-0020-x.
30. Яшечкин Ю.И., Найденова Е.В., Бугоркова Т.В., Щербакова С.А. Создание базы данных по характеристикам нуклеотидных последовательностей геномов штаммов возбудителей бактериальных и вирусных инфекций I–II групп патогенности. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 1:70–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-70-73.

References

1. Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22(34):7824–40. DOI: 10.3748/wjg.v22.i34.7824.
2. Mukomolov S.L., Levakova I.A. [Epidemiological characteristics of chronic viral hepatitis in the Russian Federation in 1999–2009]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2011; 1(3):255–62. DOI: 10.15789/2220-7619-2011-3-255-262.
3. Borgia S.M., Hedskog C., Parhy B., Hyland R.H., Stamm L.M., Brainard D.M., Subramanian M.G., McHutchison J.G., Mo H., Svarovskaia E., Shafraan S.D. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C Virus into 8 genotypes. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(11):1722–9. DOI: 10.1093/infdis/jiy401.
4. Gower E., Estes C., Blach S., Razavi-Shearer K., Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 2014; 61(1):S45–57. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.07.027.
5. Messina J.P., Humphreys I., Flaxman A., Brown A., Cooke G.S., Pybus O.G., Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2015; 61(1):77–87. DOI: 10.1002/hep.27259.
6. Soboлева N.V., Carlsen A.A., Kozhanova T.V., Kichatova V.S., Klushkina V.V., Isaeva O.V., Ignatieva M.E., Romanenko V.V., Oorzhak N.D., Malinnikova E.Yu., Kuregyan K.K., Mikhailov M.I. [The prevalence of hepatitis C virus among the conditionally healthy population of the Russian Federation]. *Zhurnal Infektologii [Infectology Journal]*. 2017; 9(2):56–64. DOI: 10.22625/2072-6732-2017-9-2-56-64.
7. Asselah T., Boyer N., Saadoun D., Martinot-Peignoux M., Marcellin P. Direct-acting antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection: optimizing current IFN-free treatment and future perspectives. *Liver Int.* 2016; 36(1):47–57. DOI: 10.1111/liv.13027.
8. World Health Organization. Global health sector strategy on viral hepatitis, 2016–2021: towards ending viral hepatitis. 2016. (Cited 11 May 2020). [Internet]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246177/1/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf>.
9. Salazar-Vizcaya L., Kouyos R.D., Metzner K.J., Caraballo Cortes K., Böni J., Shah C., Fehr J., Braun D.L., Bernasconi E., Mbunkah H.A., Hoffmann M., Labhardt N., Cavassini M., Rougemont M., Günthard H.F., Keiser O., Rauch A. Swiss HIV cohort study. Changing trends in international versus domestic HCV transmission in HIV-positive men who have sex with men: a perspective for the direct-acting antiviral scale-up era. *J. Infect. Dis.* 2019; 220(1):91–9. DOI: 10.1093/infdis/jiz069.

10. Kouyos R.D., Rauch A., Böni J., Yerly S., Shah C., Aubert V., Klimkait T., Kovari H., Calmy A., Cavassini M., Battegay M., Vernazza P.L., Bernasconi E., Ledergerber B., Günthard H.F. Swiss HIV cohort study (SHCS). Clustering of HCV coinfections on HIV phylogeny indicates domestic and sexual transmission of HCV. *Int. J. Epidemiol.* 2014; 43(3):887–96. DOI: 10.1093/ije/dyt276.
11. Martin N.K., Boerekamps A., Hill A.M., Rijnders B.J.A. Is hepatitis C virus elimination possible among people living with HIV and what will it take to achieve it? *J. Int. AIDS Soc.* 2018; 2:e25062. DOI: 10.1002/jia2.25062.
12. Thornton A.C., Jose S., Bhegani S., Chadwick D., Dunn D., Gilson R., Main J., Nelson M., Rodger A., Taylor C., Youssef E., Leen C., Gompels M., Kegg S., Schwenk A., Sabin C. UK Collaborative HIV cohort (UK CHIC) steering committee. Hepatitis B, Hepatitis C, and mortality among HIV-positive individuals. *AIDS.* 2017; 31(18):2525–32. DOI: 10.1097/QAD.0000000000001646.
13. Thompson A.J., McHutchison J.G. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). *J. Viral. Hepat.* 2009; 16:377–87. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2009.01124.x.
14. Welzel T.M., Bhardwaj N., Hedskog C., Chodavarapu K., Camus G., McNally J., Brainard D., Miller M.D., Mo H., Svarovskaia E., Jacobson L., Zeuzem S., Agarwal K. Global epidemiology of HCV subtypes and resistance-associated substitutions evaluated by sequencing-based subtype analyses. *J. Hepatol.* 2017; 67(2):224–36. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.03.014.
15. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7):1870–4. DOI: 10.1093/molbev/msw054.5.
16. Chamie G., Bonacini M., Bangsberg D.R., Stapleton J.T., Hall C., Overton E.T., Scherzer R., Tien P.C. Factors associated with seronegative chronic hepatitis C virus infection in HIV infection. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 44:577–83. DOI: 10.1086/511038.
17. Gul A., Ali I., Gul N., Ahmed J. Amino acid mutations in NS5B protein among treatment-naïve genotype 3a infected patients. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* 2019; 29(12):1149–52.
18. Asahina Y., Izumi N., Enomoto N., Uchihara M., Kurosaki M., Onuki Y., Nishimura Y., Ueda K., Tsuchiya K., Nakanishi H., Kitamura T., Miyake S. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2005; 43(4):623–29. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.05.032.
19. Wyles D.L., Luetkemeyer A.F. Understanding hepatitis C virus drug resistance: clinical implications for current and future regimens. *Top. Antivir. Med.* 2017; 25(3):103–9.
20. Nelson D.R., Cooper J.N., Lalezari J.P., Lawitz E., Pockros P.J., Gitlin N. All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology.* 2015; 61(4):1127–35. DOI: 10.1002/hep.27726.
21. Bagaglio S., Uberti-Foppa C., Messina E., Merli M., Hasson H., Andolina A., Galli A., Lazzarin A., Morsica G. Distribution of natural resistance to NS3 protease inhibitors in hepatitis C genotype 1a separated into clades 1 and 2 and in genotype 1b of HIV-infected patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 2016; 22(4):386.e1–3. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.12.007.
22. Wu R., Geng D., Chi X., Wang X., Gao X., Xu H., Shi Y., Guan Y., Wang Y., Jin J., Ding Y., Niu J. Computational analysis of naturally occurring resistance-associated substitutions in genes NS3, NS5A, and NS5B among 86 subtypes of hepatitis C virus worldwide. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12:2987–3015. DOI: 10.2147/IDR.S218584.
23. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(11):3173–88. DOI: 10.1099/vir.0.80401-0.
24. Paolucci S., Fiorina L., Mariani B., Gulminetti R., Novati S., Barbarini G., Bruno R., Baldanti F. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virol. J.* 2013; 10:355. DOI: 10.1186/1743-422X-10-355.
25. Suzuki F., Sezaki H., Akuta N., Suzuki Y., Seko Y., Kawamura Y., Hosaka T., Kobayashi M., Saito S., Arase Y., Ikeda K., Kobayashi M., Mineta R., Watahiki S., Miyakawa Y., Kumada H. Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *J. Clin. Virol.* 2012; 54(4):352–4. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.04.024.
26. Welsch C., Schweizer S., Shimakami T., Domingues F.S., Kim S., Lemon S.M., Antes I. Ketoamide resistance and hepatitis C virus fitness in val55 variants of the NS3 serine protease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56:1907–15. DOI: 10.1128/AAC.05184-11.
27. Fridell R.A., Wang C., Sun J.H., O'Boyle D.R., Nower P., Valera L., Qiu D., Roberts S., Huang X., Kienzie B., Bifano M., Nettles R.E., Gao M. Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor BMS-790052 in humans: in vitro and in vivo correlations. *Hepatology.* 2011; 54(6):1924–35. DOI: 10.1002/hep.24594.
28. Kichatova V.S., Kyuregyan K.K., Soboleva N.V., Karlson A.A., Isaeva O.V., Isagulians M.G., Mikhailov M.I. Frequency of interferon-resistance conferring substitutions in amino acid positions 70 and 91 of core protein of the Russian HCV 1b isolates analyzed in the T-cell epitopic context. *J. Immunol. Res.* 2018; 7:7685371. DOI: 10.1155/2018/7685371.
29. Tsui J.I., Ko S.C., Krupitsky E., Lioznov D., Chaisson C.E., Gnatienko N., Samet J.H. Insights on the Russian HCV Care Cascade: Minimal HCV Treatment for HIV/HCV co-infected PWID in St. Petersburg. Version 2. *Hepatol. Med. Policy.* 2016; 1:13. DOI: 10.1186/s41124-016-0020-x.
30. Yashechkin Yu.I., Naydenova E.V., Bugorkova T.V., Shcherbakova S.A. Setting-up of the database on the nucleotide sequences of the genomes of the strains of bacterial and viral infections agents of the I–II pathogenicity groups. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2013; (1):70–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-70-73.

Authors:

Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Zueva E.B., Serikova E.N., Shchemeliev A.N. Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 14, Mira St., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Boumbaly S. Research Institute of Applied Biology; Kindia, Republic of Guinea. Centre International de Recherche sur les Infections Tropicales en Guinée/International Research Center on Tropical Infections in the Republic of Guinea; Nzerekare, Republic of Guinea. E-mail: drboumbaly@yahoo.fr.

Balde T.A.L. Research Institute of Applied Biology. Kindia, Republic of Guinea. E-mail: thiernoamadoulabe.balde@gmail.com.

Semenov A.V. Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 14, Mira St., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation; e-mail: pasteur@pasteurorg.ru. Saint-Petersburg State Medical University n.a. acad. I.P. Pavlov; Saint Petersburg, Russian Federation. North-Western State Medical University n.a. I.I. Mechnikov; Saint Petersburg, Russian Federation.

Об авторах:

Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Boumbaly S. Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи; Гвинейская Республика, Киндия. Международный исследовательский центр по тропическим инфекциям в Гвинеи; Гвинейская Республика, Нзерекаре. E-mail: drboumbaly@yahoo.fr.

Balde T.A.L. Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи. Гвинейская Республика, Киндия. E-mail: thiernoamadoulabe.balde@gmail.com.

Семенов А.В. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера; Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14; e-mail: pasteur@pasteurorg.ru. Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова; Российская Федерация, Санкт-Петербург. Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова. Российская Федерация, Санкт-Петербург.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-106-113

УДК 616.98:578.2

А.Ю. Попова^{1,2}, Е.Б. Ежлова¹, А.А. Мельникова¹, С.В. Балахонов³, М.В. Чеснокова³, В.И. Дубровина³, Л.В. Лялина⁴, В.С. Смирнов⁴, А.Г. Трухина³, А.Н. Пережогин³, А.Б. Пятидесятникова³, Д.Д. Брюхова³, Н.О. Киселева³, Н.Г. Gefan³, О.В. Гаврилова³, Т.А. Гаврилова⁵, В.И. Ломоносова⁴, А.А. Тотолян⁴

ОПЫТ ИССЛЕДОВАНИЯ СЕРОПРЕВАЛЕНТНОСТИ К ВИРУСУ SARS-COV-2 НАСЕЛЕНИЯ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ В ПЕРИОД ВСПЫШКИ COVID-19

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

²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Российская Федерация;

³ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», Иркутск, Российская Федерация;

⁴ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ⁵Управление Роспотребнадзора по Иркутской области, Иркутск, Российская Федерация

Целью сероэпидемиологического исследования явилось определение уровня и структуры популяционно-го иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Иркутской области в период роста заболеваемости COVID-19. **Материалы и методы.** Содержание антител к SARS-CoV-2 определяли в сыворотке крови добровольцев методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов «ИФА анти-SARS-Cov-2 IgG» (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск). **Результаты и обсуждение.** Исследование показало, что популяционный иммунитет среди населения Иркутской области в период обследования составил 5,8 %. Максимальный уровень серопозитивных лиц выявлен среди детей 14–17 лет – 13,8 %, и у дошкольников (1–6 лет) – 11,8 %. Установлено, что при наличии контактов с больными COVID-19 риск инфицирования возрастает в 3,1 раза. После заболевания COVID-19 антитела вырабатываются в 56,5 % случаев. Доля бессимптомных форм среди серопозитивных жителей Иркутской области достигала 81,2 %. Следовательно, в выбранный для исследования период эпидемического подъема заболеваемости COVID-19 среди населения Иркутской области сформировался невысокий уровень серопревалентности. Значительная доля бессимптомных форм инфекции характеризует высокую интенсивность скрыто развивающегося эпидемического процесса. Полученные результаты могут использоваться при организации профилактических мероприятий, включая вакцинацию, и для прогнозирования заболеваемости.

Ключевые слова: гуморальный иммунитет, специфические антитела, COVID-19, SARS-CoV-2.

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

Для цитирования: Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Балахонов С.В., Чеснокова М.В., Дубровина В.И., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Трухина А.Г., Пережогин А.Н., Пятидесятникова А.Б., Брюхова Д.Д., Киселева Н.О., Gefan Н.Г., Гаврилова О.В., Гаврилова Т.А., Ломоносова В.И., Тотолян А.А. Опыт исследования серопревалентности к вирусу SARS-CoV-2 населения Иркутской области в период вспышки COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:106–113. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-106-113

Поступила 10.09.20. Принята к публ. 16.09.20.

A.Yu. Popova^{1,2}, E.B. Ezhlova¹, A.A. Mel'nikova¹, S.V. Balakhonov³, M.V. Chesnokova³, V.I. Dubrovina³, L.V. Lyalina⁴, V.S. Smirnov⁴, A.G. Trukhina³, A.N. Perezhogin³, A.B. Pyatidesyatnikova³, D.D. Bryukhova³, N.O. Kiseleva³, N.G. Gefan³, O.V. Gavrilova³, T.A. Gavrilova⁵, V.I. Lomonosova⁴, A.A. Totolyan⁴

Experience in Studying Seroprevalence to SARS-CoV-2 Virus in the Population of the Irkutsk Region during COVID-19 Outbreak

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

²Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation;

³Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russian Federation;

⁴Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint-Petersburg, Russian Federation;

⁵Rospotrebnadzor Administration in the Irkutsk Region, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Objective of the seroepidemiological study was to determine the level and structure of herd immunity to SARS-CoV-2 among the population of the Irkutsk Region during the period of an increase in the incidence of COVID-19. **Materials and methods.** The content of antibodies to SARS-CoV-2 was determined by ELISA applying a reagent panel “ELISA anti-SARS-Cov-2 IgG” produced by the State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology (Obolensk). **Results and discussion.** The investigation has revealed that the herd immunity of the total population of Irkutsk Region amounted to 5.8 %. The greatest share of seropositive persons was among the children aged 14–17 (13.8 %) and 1–6 (11.8 %). It has been established that the risk of infection increases by 3.1 times in case of contact with COVID-19 patients. After exposure to COVID-19, antibodies were produced in 56.5 % of the cases. The share of asymptomatic forms among seropositive residents of the Irkutsk Region reached 81.2 %. Consequently, during the chosen period of increased COVID-19 incidence among the population of Irkutsk Region low level of seroprevalence was formed. A significant proportion of asymptomatic forms of infection characterize high intensity of the latently developing epidemic process. The results obtained can be used when organizing preventive measures, including vaccination, and for forecasting morbidity rates.

Key words: humoral immunity, COVID-19, specific antibodies, IgM, IgG, SARS-CoV-2.

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

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

Citation: Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Balakhonov S.V., Chesnokova M.V., Dubrovina V.I., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Trukhina A.G., Perezhogin A.N., Pyatidesyatnikova A.B., Bryukhova D.D., Kiseleva N.O., Gefan N.G., Gavrilova O.V., Gavrilova T.A., Lomonosova V.I., Totolyan A.A. Experience in Studying Seroprevalence to SARS-CoV-2 Virus in the Population of the Irkutsk Region during COVID-19 Outbreak. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:106–113. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-106-113

Received 10.09.20. Accepted 16.09.20.

Popova A.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-5307>
Balakhonov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>
Chesnokova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5489-9363>
Dubrovina V.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8561-6207>
Lyalina L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9921-3505>
Smirnov V.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2723-1467>
Trukhina A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8801-2713>
Perezhogin A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5678-468X>
Pyatidesyatnikova A.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6381-4517>
Bryukhova D.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5589-9522>
Kiseleva N.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6678-2998>
Gefan N.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9425-2273>
Gavrilova O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8349-2431>
Totolyan A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

В Российской Федерации (РФ) первые завозные случаи COVID-19 зарегистрированы 31.01.2020 г. в Чите и Тюмени, при этом до 24.03.2020 г. регистрировалась только спорадическая заболеваемость в разных регионах РФ и лишь с конца марта рост приобрел практически экспоненциальный характер. Максимальное число зараженных пришлось на 16.05.2020 г. и составило за сутки 11656 человек. В дальнейшем (на 15.08.2020 г.) наблюдалось постепенное снижение до 5061 человека [1]. Наибольшее число инфицированных выявлено в Москве, Московской области и Санкт-Петербурге – территориях с наибольшей плотностью населения, причем в Санкт-Петербурге число заражений в 7,6 раз меньше, чем в Москве [2]. Иркутская область по числу зараженных на момент проведения настоящего исследования находилась на седьмом месте (15324 человека).

Первый случай заражения SARS-CoV-2 в Иркутской области выявлен 21.03.2020 г. (12-я календарная неделя – к.н.) у 62-летней женщины, вернувшейся из Объединенных Арабских Эмиратов. До 20.04.2020 г. заболеваемость в регионе варьировала в пределах от 0,3 до 1,1 на 100 тыс. населения, с 27.04.2020 г. (18 к.н.) отмечено непрерывное нарастание количества заражений, продолжавшееся до 27 к.н. (29.06–05.07.2020 г.), когда показатель заболеваемости достиг максимального значения в 70,8 на 100 тыс. населения, после чего отмечалось его постепенное снижение (рис. 1).

Как следует из представленного графика, период проведения серозидемиологического обследования населения пришелся на пик заболеваемости в области (рис. 1). Это обстоятельство неизбежно вызывает вопрос о возможном влиянии роста числа зараженных на уровень серопревалентности населения Иркутской области.

Известно, что напряженность коллективного иммунитета оказывает существенное влияние на уровень инфекционной заболеваемости [3]. Общеизвестно, что инфекционный процесс спонтанно угасает, когда число лиц, содержащих в крови специфические антитела (АТ) к возбудителю, достигает 60–70 % от популяции [4]. Существует несколько направлений достижения подобного уровня

серопревалентности. Наиболее простым путем приобретения коллективного иммунитета является спонтанная заболеваемость 60–70 % восприимчивых лиц в популяции в условиях отсутствия контроля за инфекцией. Так развивалось большинство эпидемий в средние века. Как правило, достижение требуемого эпидемического порога сопровождалось неприемлемым ущербом в виде высокой смертности среди заболевших. Пример такого развития событий – хорошо известная пандемия гриппа в начале XX в. Другой путь – вакцинация. Общеизвестно, что это наиболее эффективный и безопасный путь борьбы с инфекцией. Применительно к COVID-19 в этом направлении достигнуты определенные успехи, свидетельствующие о высокой вероятности получения эффективных вакцин в ближайшее время [5]. В России уже зарегистрирован препарат для специфической профилактики новой коронавирусной инфекции, обладающий, по данным клинических испытаний, хорошими показателями безопасности и эффективности [6]. Но, как считают D. Robison и G. Lhermie [7], челове-

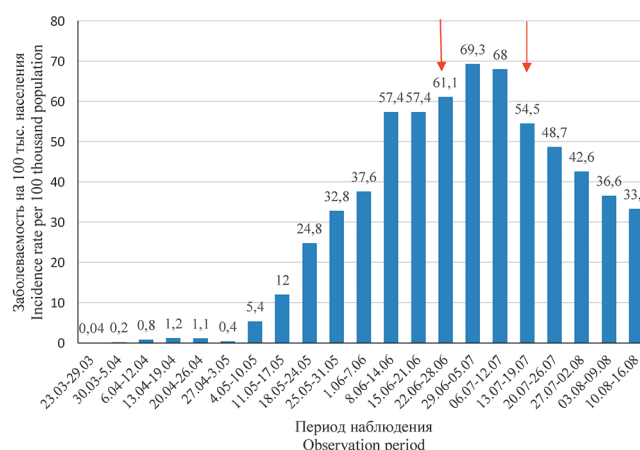


Рис. 1. Заболеваемость COVID-19 в Иркутской области в 2020 г.

Примечание: красными стрелками отмечены начало и окончание исследований серопревалентности к SARS-CoV-2 среди населения Иркутской области (с 28.06. по 19.07.2020 г.).

Fig. 1. The incidence of COVID-19 in the Irkutsk Region in 2020

Note: Red arrows mark the onset and the end of the studies of seroprevalence to SARS-CoV-2 among the population of the Irkutsk Region (June 28 – July 19, 2020).

ству пока придется научиться жить с коронавирусом, разумно сочетая спонтанный рост серопревалентности с возможными терапевтическими средствами [7, 8] и оптимальным набором мер противоэпидемической защиты, реализация которых не должна сопровождаться неприемлемым ущербом для экономики или мировой финансовой системы. Важным этапом в этом направлении может стать мониторинг популяционного иммунитета к SARS-CoV-2.

Целью проведенного сероэпидемиологического исследования стало определение уровня и структуры популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Иркутской области на фоне роста заболеваемости COVID-19.

Материалы и методы

Работа проводилась в рамках широкомасштабного проекта Роспотребнадзора по оценке популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 у населения РФ с учетом протокола исследования, рекомендованного ВОЗ [9]. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Перед началом исследования все волонтеры или их юридические представители ознакомились с целью и методикой исследования и подписали информированное согласие на участие в нем.

Отбор добровольцев для исследования проводили методом анкетирования и рандомизации путем случайной выборки. Критерием исключения являлась активная инфекция COVID-19 в момент анкетирования. Объем выборки определяли по формуле:

$$n = \frac{t^2 \cdot p(1-p)}{m^2},$$

где n – объем выборки;

t – уровень точности (для 95 % ДИ $t=1,96$);

p – оценочная распространенность изучаемого явления (в данном случае при 50 % = 0,5);

m – допустимая ошибка – 5 % [10].

Расчет объема возрастной группы:

$n = 1,96^2 \cdot 0,5(1 - 0,5) / 0,05^2 = 384$ человека.

В исследовании по оценке серопревалентности к SARS-CoV-2 приняли участие 2674 добровольца, распределенных на 7 возрастных групп (табл. 1).

В связи с возрастными особенностями созревания иммунной системы, группа «дети 1–17 лет» разделена на 3 подгруппы: 1–6 лет, 7–13 лет и 14–17 лет. По численности все возрастные группы волонтеров являлись сопоставимыми и составляли 373–390 человек (табл. 1). По гендерному признаку группа включала 796 мужчин и 1804 женщины, то есть соотношение составило 1:2,3.

Доля лиц, переболевших COVID-19, с диагнозом, установленным в медицинских организациях, среди обследованных добровольцев не превышала 1,8 % (49 человек), а доля волонтеров, имевших при-

Таблица 1 / Table 1

Распределение волонтеров по возрасту

Distribution of volunteers by age

Возрастная группа Age group		Число обследованных The number of people examined
1–17		387
из них: among them:	1–6	102
	7–13	191
	14–17	94
18–29		385
30–39		373
40–49		374
50–59		386
60–69		390
70 и старше 70 years old and above		379
Итого: Total:		2674

знаки острого респираторного заболевания (ОРЗ) в день обследования, составила 0,4 % (10 человек).

По территориям в населенных пунктах с репрезентативной выборкой (30 и более участников) наибольшее число волонтеров пришлось на Иркутск (1429), наименьшее – на Шелеховский район Иркутской области (30).

Пробы крови волонтеров отбирали в пробирки с активатором свертывания и гелем, центрифугировали при 1500 об./мин (400 g) в течение 20 мин и отделяли сыворотку от сгустка. Полученную сыворотку переносили в пластиковые пробирки и хранили до исследования при температуре 4 °С. Содержание антител к SARS-CoV-2 определяли методом ИФА с использованием набора реагентов «ИФА анти-SARS-CoV-2 IgG» (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск). Результаты учитывали качественным методом и считали положительными при превышении уровня cut-off, расчет которого осуществляется в соответствии с инструкцией к тест-системе.

Статистическую обработку проводили с использованием методов вариационной статистики с помощью статистического пакета Excel и программного продукта WinPepi (версия 11.65). Связь между уровнями заболеваемости и серопревалентности рассчитывали по методу Пирсона. Для оценки достоверности различий сравниваемых показателей использовали уровень вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Возрастное и географическое распределение серопревалентности среди населения Иркутской области. Серопревалентность среди жителей Иркутской области (табл. 2) в целом составила $(5,8 \pm 0,45) \%$ (154/2674), что существенно ниже, чем в ряде других регионов РФ [11]. По воз-

Таблица 2 / Table 2

Серопревалентность к вирусу SARS-CoV-2 в обследованных возрастных группах населения Иркутской области

Seroprevalence to SARS-CoV-2 virus in the surveyed age groups of the Irkutsk Region

Возрастная группа Age group		Результаты тестирования на SARS-CoV-2 IgG Test results for SARS-CoV-2 IgG		Серопревалентность, % (M ± m) Seroprevalence, % (M ± m)
		серопозитивные, чел. seropositive, pers.	серонегативные, чел. seronegative, pers.	
1–17		31	356	8,0±1,4*
в том числе including	1–6	12	90	11,8±3,2*
	7–13	6	185	3,1±1,2
	14–17	13	81	13,8±3,5*
18–29		26	359	6,8±1,3
30–39		15	358	4,0±1,0
40–49		16	358	4,3±1,1
50–59		17	369	4,4±1,0
60–69		14	376	3,6±0,9
70 и старше 70 years old and above		35	344	9,2±1,5*
Итого: Total:		154	2520	5,8±0,4

Примечание: * – достоверные различия по сравнению со средним значением по всей когорте волонтеров ($p < 0,05$).

Note: * – significant differences as compared to the median value for the entire cohort of volunteers ($p < 0,05$).

растным группам показатель варьировал в пределах от (3,6±1,25) % у лиц в возрасте 60–69 лет до (8,0±3,5) % у детей 1–17 лет. Особенностью детской группы стала заметная неоднородность показателя серопозитивности. Так, среди детей в возрасте 14–17 лет частота выявления специфических IgG к нуклеокапсиду (N-антигену) вируса оказалась наивысшей и составила (13,8±3,5) %, тогда как в возрастной группе 7–13 лет минимальной – (3,1±1,25) %. Среди детей дошкольного возраста (1–6 лет) этот показатель оказался на уровне (11,8±3,2) %, что меньше, чем в старшей возрастной группе, но достоверно выше, чем в среднем по региону. Серопревалентность не имела гендерных различий и составляла (6,3±0,9) % у мужчин и (5,5±0,5) % у женщин.

По муниципальным образованиям Иркутской области (табл. 3) серопревалентность находилась в диапазоне от (1,1±1,1) % в Боханском районе до (12,5±4,1) % в Иркутском районе. Низкий уровень серопозитивности установлен также в Усть-Илимском (2,8±1,6 %) районе, а высокий – в Шелеховском (10,0±5,5 %) и Усольском (9,0±2,5 %) районах. Оценить достоверность статистических данных в четырех населенных пунктах (г. Бодайбо, г. Тулун, г. Черемхово, п. Усть-Ордынск) можно лишь ориентировочно, поскольку количество обследованных лиц на этих территориях составило менее 30 человек.

Для обоснования связи заболеваемости и серопревалентности проведен корреляционный анализ уровня заболеваемости в ряде муниципальных образований Иркутской области и серопревалентности. Анализ данных подтвердил наличие корреляции между сравниваемыми показателями с коэффициентом 0,644. При сравнении с пороговым значением

получены данные, свидетельствующие о линейной связи, достоверной при $p < 0,05$. Полученная зависимость описывается уравнением линейной регрессии: $y = 0,0183x + 3,4978$ (рис. 2).

Уровень серопозитивности у лиц, переболевших или имевших контакт с больными COVID-19. В период эпидемической вспышки человек может иметь множество контактов с патогенным вирусом. К ним относятся, в частности, контакт с вирусосителем, у которого возбудитель уже начал реплицироваться, но манифестация заболевания еще не на-

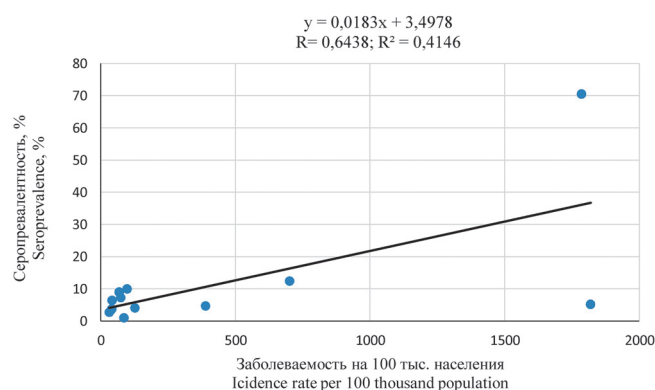


Рис. 2. Корреляционная зависимость между уровнем заболеваемости и серопревалентностью

Примечание: коэффициент корреляции (r_c) равен 0,644. Пороговый коэффициент корреляции r_{st} при $k = n - 2$ и $p < 0,05$, составляет 0,602. $r_c > r_{st}$. Установлена прямая корреляционная связь между сравниваемыми показателями, описываемая уравнением линейной регрессии: $y = 0,0183x + 3,4978$.

Fig. 2. Correlation interdependence between the incidence rate and seroprevalence

Note: The correlation coefficient (r_c) is 0.644. The threshold correlation coefficient r_{st} for $k = n - 2$ and $p < 0.05$ is 0.602. $r_c > r_{st}$. A direct correlation between the compared indicators, described by the linear regression equation: $y = 0.0183x + 3.4978$ has been established.

Таблица 3 / Table 3

Уровень серопревалентности среди жителей разных муниципальных образований Иркутской области

Seroprevalence level among residents of different municipalities of the Irkutsk Region

Населенный пункт Locality	Число обследованных The number of people examined	Результаты тестирования на SARS-CoV-2 IgG Test results for SARS-CoV-2 IgG		Серопревалентность, % (M±m) Seroprevalence, % (M±m)	Заболеваемость на 100 тыс. населения** Morbidity rate per 100 thousand of the population**
		серопозитивные, чел. seropositive, pers.	серонегативные, чел. seronegative, pers.		
Ангарский район, г. Ангарск Angarsk District, Angarsk	357	26	331	7,3±1,4	73,62
Братский район, г. Братск Bratsk District, Bratsk	191	8	183	4,2±1,5	126,63
Бодайбинский район Bodaibinsky District	17*	12	5	70,6±11,0	1783,6
Боханский район Bokhansky District	93	1	92	1,1±1,1	84,50
г. Иркутск Irkutsk	1429	68	1361	4,8±0,6	388,22
Иркутский район Irkutsk District	64	8	56	12,5±4,1	699,81
Саянский район, г. Саянск Sayansk District, Sayansk	77	5	72	6,5±2,8	41,37
Тайшетский район, г. Тайшет Taishet District, Taishet	80	3	77	3,8±2,1	40,07
Тулунский район Tulunsky District	8*	0	8	0	22,71
Усольский район, г. Усолье-Сибирское Usolsky District, Usolye-Sibirskoe	133	12	121	9,0±2,5	67,32
Усть-Илимский район Ust-Ilimsky District	106	3	103	2,8±1,6	31,03
Усть-Кутский район Ust-Kutsky District	75	4	71	5,3±2,6	1818,07
п. Усть-Ордынский Ust-Ordynsky settlement	1*	0	1	0	236,8
Черемховский район Cheremkhovsky District	13*	1	12	7,7±7,4	54,28
Шелеховский район Shelekhovsky District	30	3	27	10,0±5,5	97,02

Примечание: * – оценить достоверность доли серопозитивных лиц среди населения районов не представляется возможным, поскольку количество обследованных добровольцев было менее 30; ** – результаты по заболеваемости представлены Управлением Роспотребнадзора по Иркутской области.

Note: * – it is not possible to assess the significance of the proportion of seropositive persons among the population of surveyed Districts, since the number of examined volunteers was less than 30; ** – the data on the incidence rates are presented by the Rospotrebnadzor Administration in the Irkutsk Region.

чалась, и контакт с больным COVID-19 – ситуация, с которой особенно часто встречаются медицинские работники. Эпидемиологическую опасность представляют лица с abortивным или бессимптомным течением заболевания и, возможно, реконвалесценты COVID-19 [12]. Считается, что вирус у реконвалесцентов может выделяться в течение продолжительного времени, заражая окружающих. При этом такое заражение совсем не обязательно должно закончиться появлением клинической симптоматики, а отражением скрытой инфекции может быть серопревалентность [13].

Среди лиц, имевших бытовой и/или производственный контакт с переболевшим COVID-19, серопревалентность составила (14,7±2,1) %, а при от-

сутствии таковых была в 3,1 раза ниже (4,7±0,4) % ($p<0,05$).

В группе реконвалесцентов после перенесенного COVID-19 (49 человек) доля серопозитивных лиц достигла (56,5±7,73) %, а при отсутствии данных о перенесенной инфекции – (11,9±0,6) % ($p<0,05$).

Из всей когорты волонтеров 10 человек имели на момент обследования признаки ОРЗ. Доля сероположительных лиц в этой группе составила (80,0±12,6) %, а среди лиц без признаков ОРЗ – (5,5±0,4) %, что достоверно не отличалось от среднего популяционного показателя по региону. Объяснений этому феномену пока еще не получено, можно только с некоторой долей вероятности предположить, что увеличение удельного веса серопозитивных

больных ОРЗ могло иметь неспецифическое происхождение, обусловленное гетеротипическим иммунитетом, вызванным другими β -коронавирусами человека, имеющими общие детерминанты с антигенами SARS-CoV-2 [14].

Оценка доли бессимптомных форм. Бессимптомное течение является характерным признаком COVID-19 и, как считается, может служить важным фактором трансмиссии вируса [15]. В этом смысле определение доли бессимптомных форм среди населения представляет существенное значение в плане распространения инфекции в непораженной популяции [16, 17] и может в значительной мере скорректировать спектр и направление противоэпидемических мероприятий.

Для расчета доли бессимптомных форм среди серопозитивных волонтеров вычисляли долю лиц, у которых отсутствует хотя бы один признак: диагноз COVID-19, положительный результат в ПЦР, либо проявления ОРЗ. Среди жителей Иркутской области этот показатель в целом составлял $(81,2 \pm 3,2) \%$, достигая максимального уровня у лиц в возрасте старше 70 лет (табл. 4). Более низкие показатели зафиксированы среди лиц трех возрастных групп: 18–29, 30–39 и 40–49 лет. Однако в связи с тем, что в большинстве обследованных возрастных групп число наблюдений оказалось ниже 30, все полученные сведения могут рассматриваться только как ориентировочные. На это обстоятельство указывают и достаточно высокие уровни статистических ошибок средних величин.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о низком уровне популяционного иммунитета ($5,8 \%$) среди жителей Иркутской области на фоне заболеваемости 273,05 на 100 тыс. населения и высокой доле серопозитивных лиц с бессимптомным течением заболевания ($81,2 \%$). В связи с этим можно сделать предположение о невысокой напряженности инфекционного процесса. Однако для такого вывода требуются более масштабные динамические исследования.

Факт высокой серопревалентности в детских

возрастных группах 14–17 ($13,8 \%$) и 1–6 лет ($11,8 \%$), установленный и в других регионах [11], привлекает особое внимание. К сожалению, в настоящее время трудно дать ему удовлетворительное объяснение, можно лишь предположить возможную связь высокой серопревалентности у детей с формированием перекрестного иммунитета к другим непатогенным коронавирусам [18]. Вероятно, что перекрестным иммунитетом можно объяснить и частоту бессимптомного течения COVID-19 как среди детей, так и взрослых. Однако эта гипотеза требует основательных доказательств. Среди других возрастных групп каких-либо особенностей не выявлено, если не считать достоверного повышения уровня серопревалентности среди волонтеров в возрасте старше 70 лет ($9,2 \%$).

При обследовании контактных лиц и реконвалесцентов наблюдали ожидаемый рост серопревалентности ($14,7$ и $56,5 \%$ соответственно). Различия достоверны по сравнению с показателем серопревалентности среди всех обследованных волонтеров при $p < 0,05$. Отмечена высокая доля серопозитивных лиц с симптомами ОРЗ ($80,0 \%$), но придавать этому существенное значение вряд ли оправданно, т.к. общее число добровольцев с симптомами ОРЗ не превысило 10 человек.

Количество выявленных серопозитивных лиц с бессимптомным течением ($81,2 \%$) сопоставимо с показателями других регионов [19]. Однако среди обследованных добровольцев в группе «40–49 лет» их доля оказалась на уровне $62,5 \%$, а группе «30–39 лет» не превышала $53,3 \%$, что согласуется в целом с низкой серопревалентностью в этих возрастных группах.

Резюмируя представленные данные, следует отметить невысокий уровень серопревалентности среди населения Иркутской области, сопровождавшийся умеренной заболеваемостью. В связи с этим возникает вопрос о наличии и характере связи между наблюдающимся снижением еженедельной заболеваемости, начиная с 28 к.н. (06.07–12.07.2020 г.) и невысоким уровнем гуморального иммунитета.

Таблица 4 / Table 4

Доля лиц с бессимптомным течением инфекции из общего числа серопозитивных жителей разных возрастных групп Иркутской области
The share of persons with asymptomatic infection out of the total number of seropositive residents of different age groups of the Irkutsk Region

Возрастная группа Age group	Число серопозитивных Number of seropositive persons	Число лиц с бессимптомным течением The number of asymptomatic people	Доля лиц с бессимптомным течением, % ($M \pm m$) The proportion of people with asymptomatic form, % ($M \pm m$)
1–17	31	30	$96,8 \pm 3,1$
18–29	26	18	$69,2 \pm 9$
30–39	15	8	$53,3 \pm 13$
40–49	16	10	$62,5 \pm 12,1$
50–59	17	12	$70,6 \pm 11$
60–69	14	12	$85,7 \pm 9,4$
70 и старше 70 years old and above	35	35	100
Итого: Total:	154	125	$81,2 \pm 3,2$

Таким образом, популяционный иммунитет к вирусу SARS-CoV-2 среди населения Иркутской области составил 5,8 %. Максимальный уровень серопревалентности выявлен среди детей в возрастной группе «14–17 лет» (13,8 %). Между серопревалентностью и заболеваемостью установлена достоверная корреляция, описываемая уравнением линейной регрессии: $y = 0,0183x + 3,4978$. При наличии у обследуемых контактов с больными COVID-19 вероятность выявления серопозитивных лиц увеличилась в 3,1 раза. После перенесенного заболевания COVID-19 антитела выявлялись в 56,5 % случаев. Доля бессимптомных форм инфекции среди серопозитивных жителей Иркутской области достигала 81,2 %.

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

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотруднику ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора А.Е. Ефимову за оказанную техническую поддержку при организации и проведении исследования.

Список литературы

1. Карта коронавируса COVID-19 онлайн. [Электронный ресурс]. URL: <https://coronavirus-monitor.info/> (дата обращения 15.08.2020).
2. Оперативные данные. [Электронный ресурс]. URL: <https://xn--80aesfpebagmfbcl0a.xn--p1ai/> (дата обращения 15.08.2020).
3. Lourenço J., Paton R., Ghafari M., Kraemer M., Thompson C., Simmonds P., Klennerman P., Gupta S. Fundamental principles of epidemic spread highlight the immediate need for large-scale serological surveys to assess the stage of the SARS-CoV-2 epidemic. 2020; medRxiv 2020.03.24.20042291. DOI: 10.1101/2020.03.24.20042291.
4. Gomes M.G.M., Corder R.M., King J.G., Langwig K.E., Souto-Maior C., Carneiro J., Gonçalves G., Penha-Gonçalves C., Ferreira M.U., Aguas R. Individual variation in susceptibility or exposure to SARS-CoV-2 lowers the herd immunity threshold. Version 3. medRxiv. 2020.04.27.20081893. DOI: 10.1101/2020.04.27.20081893.
5. Wu S.C. Progress and concept for COVID-19 vaccine development. *Biotechnol. J.* 2020; 15(6):1–3. DOI: 10.1002/biot.202000147.
6. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Lubenets N.L., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Morozova L.F., Smolyarchuk E.A., Kryukov E.V., Babira V.F., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet.* 2020; September 4. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31866-3.
7. Robison D., Lhermie G. Living With COVID-19: A systemic and multi-criteria approach to enact evidence-based health policy. *Front. Public Health.* 2020; 8:294. DOI: 10.3389/fpubh.2020.00294.
8. Смирнов В.С., Тоголян А.А. Некоторые возможности иммунотерапии при коронавирусной инфекции. *Инфекция и иммунитет.* 2020; 10(3):446–58. DOI: 10.15789/2220-7619-SPO-1470.
9. WHO. Population-based age-stratified seroepidemiological investigation protocol for COVID-19 infection. WHO/2019-nCoV/Seroepidemiology/2020.2. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Seroepidemiology-2020.2> (дата обращения 15.08.2020).
10. Newcombe R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat. Med.* 1998; 17(8):857–72. DOI: 10.1002/(sici)1097-0258(19980430)17:8<857::aid-sim777>3.0.co;2-e.

11. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Историк О.А., Мосевич О.С., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Черный М.А., Балабашева Н.С., Логинова И.С., Владимиров О.С., Самогладова И.С., Васев Н.А., Румянцев С.В., Чупалова Е.Ю., Селиванова Г.В., Муравьева М.В., Тимофеева Л.В., Ханкишиева Э.Н., Тыльчевская В.Д., Никитенко Н.Д., Костеницкая Т.И., Виркунен Н.В., Климкина И.М., Кузьмина Т.М., Дегтяренко Н.В., Базунова А.И., Филиппова Л.А., Пальчикова Н.А., Кукушкин А.В., Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Богумильчик Е.А., Воскресенская Е.А., Дробышевская В.Г., Зуева Е.В., Кокорина Г.И., Курова Н.Н., Любимова Н.Е., Ферман Р.С., Хамдулаева Г.Н., Хамитова И.В., Хорькова Е.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тоголян А.А. 2020. Опыт оценки популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Ленинградской области в период эпидемии COVID-19. COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. 28.07.2020. [Электронный ресурс]. DOI: 10.21055/preprints-3111753.
12. Walsh K.A., Jordan K., Clyne B., Rohde D., Drummond L., Byrne P., Ahern S., Carty P.G., O'Brien K.K., O'Murchu E., O'Neill M., Smith S.M., Ryan M., Harrington P. SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. *J. Infect.* 2020; 81(3):357–71. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.06.067.
13. Okba N.M.A., Müller M.A., Li W., Wang C., GeurtsvanKessel C.H., Corman V.M., Lamers M.M., Sikkema R.S., de Bruin E., Chandler F.D., Yazdanpanah Y., Quentin Le Hingrat, Descamps D., Houhou-Fidouh N., Reusken C.B.E.M., Bosch B.-J., Drosten C., Koopmans M.P.G., Haagmans B.L. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis.* 2020; 26(7):1478–88. DOI: 10.3201/eid2607.200841.
14. Ng K.W., Faulkner N., Cornish G.H., Rosa A., Harvey R., Hussain S., Ulferts R., Earl C., Wrobel A., Benton D., Roustan C., Bolland W., Thompson R., Agua-Doce A., Hobson P., Heaney J., Rickman H., Paraskevopoulou S., Houlihan C.F., Thomson K., Sanchez E., Brealey D., Shin G.Y., Spyer M.J., Joshi D., O'Reilly N., Walker P.A., Kjaer S., Riddell A., Moore C., Jebson B.R., Wilkinson M.G.L.L., Marshall L.R., Rosser E.C., Radziszewska A., Peckham H., Ciurtin C., Wedderburn L.R., Beale R., Swanton C., Gandhi S., Stocking B., McCauley J., Gambin S., McCoy L.E., Cherepanov P., Nastouli E., Kassiotis G. Pre-existing and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *BioRxiv.* 2020. Preprint. DOI: 10.1101/2020.05.14.095414.
15. Chang D., Mo G., Yuan X., Tao Y., Peng X., Wang F.-S., Xie L., Sharma L., Dela Cruz C.S., Qin E. Time kinetics of viral clearance and resolution of symptoms in novel coronavirus infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2020; 201(9):1150–2. DOI: 10.1164/rccm.202003-0524LE.
16. Yaqinuddin A. Cross-immunity between respiratory coronaviruses may limit COVID-19 fatalities. *Med. Hypotheses.* 2020; 144:110049. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.110049.
17. Yu X., Yang R. COVID-19 Transmission through asymptomatic carriers is a challenge to containment. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2020; 14(4):474–5. DOI: 10.1111/irv.12743.
18. Devulapalli C.S. COVID-19 is milder in children possibly due to cross-immunity. *Acta Paediatr.* 2020; 00:1. DOI: 10.1111/apa.15407.
19. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Фридман Р.К., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Чхинджерия И.Г., Гречанинова Т.А., Агапов К.А., Арсентьева Н.А., Баженова Н.А., Бацунов О.К., Данилова Е.М., Зуева Е.В., Комкова Д.В., Кузнецова П.Н., Любимова Н.Е., Маркова А.Н., Хамитова И.В., Ветров В.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тоголян А.А. 2020. Популяционный иммунитет к вирусу SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в активную фазу эпидемии COVID-19. COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. 28.07.2020. [Электронный ресурс]. DOI: 10.21055/preprints-3111752.

References

1. Online map of coronavirus COVID-19 distribution. (Cited 15 Aug 2020). [Internet]. Available from: <https://coronavirus-monitor.info/>.
2. Operational data. (Cited 15 Aug 2020) [Internet]. Available from: <https://xn--80aesfpebagmfbcl0a.xn--p1ai/>.
3. Lourenço J., Paton R., Ghafari M., Kraemer M., Thompson C., Simmonds P., Klennerman P., Gupta S. Fundamental principles of epidemic spread highlight the immediate need for large-scale serological surveys to assess the stage of the SARS-CoV-2 epidemic. 2020; medRxiv 2020.03.24.20042291. DOI: 10.1101/2020.03.24.20042291.
4. Gomes M.G.M., Corder R.M., King J.G., Langwig K.E., Souto-Maior C., Carneiro J., Gonçalves G., Penha-Gonçalves C., Ferreira M.U., Aguas R. Individual variation in susceptibility or exposure to SARS-CoV-2 lowers the herd immunity threshold. Version 3. medRxiv. 2020.04.27.20081893. DOI: 10.1101/2020.04.27.20081893.
5. Wu S.C. Progress and concept for COVID-19 vaccine development. *Biotechnol. J.* 2020; 15(6):1–3. DOI: 10.1002/bi-

ot.202000147.

6. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tikhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Lubenets N.L., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Morozova L.F., Smolyarchuk E.A., Kryukov E.V., Babira V.F., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020; September 4. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31866-3.

7. Robison D., Lhermie G. Living With COVID-19: A systemic and multi-criteria approach to enact evidence-based health policy. *Front. Public Health*. 2020; 8:294. DOI: 10.3389/fpubh.2020.00294.

8. Smirnov V.S., Totolian A.A. [Some opportunities for immunotherapy in coronavirus infection]. *Infektsiya i immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2020; 10(3):446–58. (In Russ.) DOI: 10.15789/2220-7619-SPO-1470.

9. WHO. Population-based age-stratified seroepidemiological investigation protocol for COVID-19 infection. WHO/2019-nCoV/Seroepidemiology/2020.2. (Cited 15 Aug 2020). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Seroepidemiology-2020.2>.

10. Newcombe R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat. Med.* 1998; 17(8):857–72. DOI: 10.1002/(sici)1097-0258(19980430)17:8<857::aid-sim777>3.0.co;2-e.

11. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Historian O.A., Mosevich O.S., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Cherny M.A., Balabashyva N.S., Loginova I.S., Vladimirova O.S., Samoglyadova I.S., Vasev N.A., Rumyantseva S.V., Chupalova E.Yu., Selivanova G.V., Muravyova M.V., Timofeeva L.V., Khankishieva E.N., Tychevskaya V.D., Nikitenko N.D., Kostenitskaya T.I., Virkunen N.V., Klimkina I.M., Kuzmina T.M., Degtyarenko N.V., Bazunova A.I., Filippova L.A., Palchikova N.A., Kukushkin A.V., Arsenyeva N.A., Batsunov O.K., Bogumilchik E.A., Voskresenskaya E.A., Drobyshevskaya V.G., Zueva E.V., Kokorina G.I., Kurova N.N., Lyubimova N.E., Ferman R.S., Khamdulaeva G.N., Khamitova I.V., Khorkova E.V., Milichkina A.M., Dedkov V.G., Totolyan A.A. 2020. Experience in assessing herd immunity to sars-cov-2 among the population of the Leningrad Region during the COVID-19 epidemic. 28 July 2020. COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. [Internet]. DOI: 10.21055/preprints-3111753.

12. Walsh K.A., Jordan K., Clyne B., Rohde D., Drummond L., Byrne P., Ahern S., Carty P.G., O'Brien K.K., O'Murchu E., O'Neill M., Smith S.M., Ryan M., Harrington P. SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. *J. Infect.* 2020; 81(3):357–71. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.06.067.

13. Okba N.M.A., Müller M.A., Li W., Wang C., GeurtsvanKessel C.H., Corman V.M., Lamers M.M., Sikkema R.S., de Bruin E., Chandler F.D., Yazdanpanah Y., Quentin Le Hingrat, Descamps D., Houhou-Fidouh N., Reusken C.B.E.M., Bosch B.-J., Drosten C., Koopmans M.P.G., Haagmans B.L. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis.* 2020; 26(7):1478–88. DOI: 10.3201/eid2607.200841.

14. Ng K.W., Faulkner N., Cornish G.H., Rosa A., Harvey R., Hussain S., Ulferts R., Earl C., Wrobel A., Benton D., Roustian C., Bolland W., Thompson R., Agua-Doce A., Hobson P., Heaney J., Rickman H., Paraskevopoulou S., Houlihan C.F., Thomson K., Sanchez E., Brealey D., Shin G.Y., Spyer M.J., Joshi D., O'Reilly N., Walker P.A., Kjaer S., Riddell A., Moore C., Jebson B.R., Wilkinson M.G.L.L., Marshall L.R., Rosser E.C., Radziszewska A., Peckham H., Ciurtin C., Wedderburn L.R., Beale R., Swanton C., Gandhi S., Stockinger B., McCauley J., Gamblin S., McCoy L.E., Cherepanov P., Nastouli E., Kassiotis G. Pre-existing and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *BioRxiv*. 2020. Preprint. DOI: 10.1101/2020.05.14.095414.

15. Chang D., Mo G., Yuan X., Tao Y., Peng X., Wang F.-S., Xie L., Sharma L., Dela Cruz C.S., Qin E. Time kinetics of viral clearance and resolution of symptoms in novel coronavirus infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2020; 201(9):1150–2. DOI: 10.1164/rccm.202003-0524LE.

16. Yaqinuddin A. Cross-immunity between respiratory coronaviruses may limit COVID-19 fatalities. *Med. Hypotheses*. 2020; 144:110049. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.110049.

17. Yu X., Yang R. COVID-19 Transmission through asymptomatic carriers is a challenge to containment. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2020; 14(4):474–5. DOI: 10.1111/irv.12743.

18. Devulapalli C.S. COVID-19 is milder in children possibly due to cross-immunity. *Acta Paediatr.* 2020; 00:1. DOI: 10.1111/apa.15407.

19. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Bashketova N.S., Fridman R.K., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Chkhinzheria I.G., Grechaninova T.A., Agapov K.A., Arsenyeva N.A., Bazhenova N.A., Batsunov O.K., Danilova E.M., Zueva E.V., Komkova D.V., Kuznetsova R.N., Lyubimova N.E., Markova A.N., Khamitova I.V., Vetrov V.V., Milichkina A.M., Dedkov V.G., Totolyan A.A. 2020. Population immunity to the SARS-CoV-2 virus among the population of St. Petersburg in the active phase of COVID-19 epidemic. COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. 28 July 2020. [Internet]. DOI: 10.21055/preprints-3111752.

Authors:

Popova A.Yu. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare; 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation. Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation.

Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation.

Balakhonov S.V., Chesnokova M.V., Dubrovina V.I., Trukhina A.G., Perezhogin A.N., Pyatidesyatnikov A.B., Bryukhova D.D., Kiseleva N.O., Gefan N.G., Gavrilova O.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Lyalina L.V., Smirnov V.S., Lomonosova V.I., Totolyan A.A. Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 14, Mira St., Saint-Petersburg, 197101, Russian Federation. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Gavrilova T.A. Rospotrebnadzor Administration in the Irkutsk Region. 8, Karla Marksa St., 664003, Irkutsk, Russian Federation. E-mail: epid@38.rospotrebnadzor.ru.

Об авторах:

Попова А.Ю. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7. Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования; Российская Федерация, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.

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

Балахонов С.В., Чеснокова М.В., Дубровина В.И., Трухина А.Г., Пережогин А.Н., Пятидесятников А.Б., Брюхова Д.Д., Киселева Н.О., Геван Н.Г., Гаврилова О.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Лялина Л.В., Смирнов В.С., Ломоносова В.И., Тотолян А.А. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Гаврилова Т.А. Управление Роспотребнадзора по Иркутской области. Российская Федерация, 664003, Иркутск, ул. Карла Маркса, 8. E-mail: epid@38.rospotrebnadzor.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-114-123

УДК 616.98:578.2

А.Ю. Попова^{1,2}, Е.Б. Ежлова¹, А.А. Мельникова¹, О.А. Историк³, О.С. Мосевич⁴, Л.В. Лялина⁵,
В.С. Смирнов⁵, М.А. Черный³, Н.С. Балабышева³, И.С. Логинова³, О.С. Владимирова³,
И.С. Самогядова³, Н.А. Васев³, С.В. Румянцева³, Е.Ю. Чупалова³, Г.В. Селиванова³, М.В. Муравьева³,
Л.В. Тимофеева³, Э.Н. Ханкишиева³, В.Д. Тыльчевская³, Н.Д. Никитенко³, Т.И. Костеницкая³,
Н.В. Виркунен³, И.М. Климкина⁴, Т.М. Кузьмина⁴, Н.В. Дегтяренко⁴, А.И. Базунова⁴, Л.А. Филиппова⁴,
Н.А. Пальчикова⁴, А.В. Кукшкин⁴, Н.А. Арсентьева⁵, О.К. Бацунов⁵, Е.А. Богумильчик⁵,
Е.А. Воскресенская⁵, В.Г. Дробышевская⁵, Е.В. Зуева⁵, Г.И. Кокорина⁵, Н.Н. Курова⁵, Н.Е. Любимова⁵,
Р.С. Ферман⁵, Г.Н. Хамдулаева⁵, И.В. Хамитова⁵, Е.В. Хорькова⁵, А.М. Миличкина⁵, В.Г. Дедков⁵,
А.А. Тотолян⁵

ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К SARS-COV-2 СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ В ПЕРИОД ЭПИДЕМИИ COVID-19

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

²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Российская Федерация;

³Управление Роспотребнадзора по Ленинградской области, Санкт-Петербург, Российская Федерация; ⁴ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ⁵ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация

В Ленинградской области первый случай COVID-19 выявлен 13 марта 2020 г. Период нарастания интенсивности эпидемического процесса продолжался 8 недель. Через один месяц после достижения максимального уровня заболеваемости организовано исследование по определению серопревалентности к COVID-19 среди населения области. **Материалы и методы.** Работа проводилась в рамках проекта Роспотребнадзора по оценке популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 у населения Российской Федерации. Содержание антител к SARS-CoV-2 определяли методом ИФА с использованием набора для анализа сыворотки или плазмы крови человека на наличие специфических IgG к нуклеокапсиду вируса SARS-CoV-2 производства Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболensk) в соответствии с инструкцией по применению. **Результаты и обсуждение.** Показано, что коллективный иммунитет населения Ленинградской области составил 20,7 %. Максимальный уровень установлен у детей 1–6 лет (42,3 %) и лиц старше 70 лет (29,0 %). Наибольший уровень серопозитивности, кроме детей и лиц старшего возраста, выявлен у безработных (25,1 %). Наименьший уровень серопревалентности установлен у госслужащих (12,8 %) и военных (16,7 %). Показано, что при наличии контактов с больными COVID-19 риск инфицирования возрастает в 1,5 раза. После инфекции COVID-19 антитела вырабатываются в 82,1 % случаев. У лиц с позитивным результатом ПЦР-анализа, полученным ранее, антитела выявляются в 82,8 % случаев. Доля бессимптомных форм среди серопозитивных жителей Ленинградской области составила 86,9 %. Результаты оценки популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 у населения Ленинградской области свидетельствуют о том, что в период COVID-19 сформировался средний уровень серопревалентности. Значительная доля бессимптомных форм инфекции характеризует высокую интенсивность скрыто развивающегося эпидемического процесса. Полученные результаты следует учитывать при организации профилактических мероприятий, включая вакцинацию, и прогнозировании заболеваемости.

Ключевые слова: COVID-19, заболеваемость, серопревалентность, бессимптомная инфекция, коронавирус SARS-CoV-2.

Корреспондирующий автор: Смирнов Вячеслав Сергеевич, e-mail: vssmi@mail.ru.

Для цитирования: Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Историк О.А., Мосевич О.С., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Черный М.А., Балабышева Н.С., Логинова И.С., Владимирова О.С., Самогядова И.С., Васев Н.А., Румянцева С.В., Чупалова Е.Ю., Селиванова Г.В., Муравьева М.В., Тимофеева Л.В., Ханкишиева Э.Н., Тыльчевская В.Д., Никитенко Н.Д., Костеницкая Т.И., Виркунен Н.В., Климкина И.М., Кузьмина Т.М., Дегтяренко Н.В., Базунова А.И., Филиппова Л.А., Пальчикова Н.А., Кукшкин А.В., Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Богумильчик Е.А., Воскресенская Е.А., Дробышевская В.Г., Зуева Е.В., Кокорина Г.И., Курова Н.Н., Любимова Н.Е., Ферман Р.С., Хамдулаева Г.Н., Хамитова И.В., Хорькова Е.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тотолян А.А. Оценка популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Ленинградской области в период эпидемии COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; 3:114–123. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-114-123

Поступила 14.09.20. Принята к публ. 16.09.20.

A.Yu. Popova^{1,2}, E.B. Ezhlova¹, A.A. Mel'nikova¹, O.A. Historik³, O.S. Mosevich⁴, L.V. Lyalina⁵,
V.S. Smirnov⁵, M.A. Cherny³, N.S. Balabysheva³, I.S. Loginova³, O.S. Vladimirova³,
I.S. Samoglyadova³, N.A. Vasev³, S.V. Rumyantseva³, E.Yu. Chupalova³, G.V. Selivanova³,
M.V. Muraviova³, L.V. Timofeeva³, E.N. Khankishieva³, V.D. Tylchevskaya³, N.D. Nikitenko³,
T.I. Kostenitskaya³, N.V. Virkunen³, I.M. Klimkina⁴, T.M. Kuzmina⁴, N.V. Degtyarenko⁴,
A.I. Bazunova⁴, L.A. Filippova⁴, N.A. Palchikova⁴, A.V. Kukshkin⁴, N.A. Arsentieva⁵, O.K. Batsunov⁵,
E.A. Bogumilchik⁵, E.A. Voskresenskaya⁵, V.G. Drobyshevskaya⁵, E.V. Zueva⁵, G.I. Kokorina⁵,
N.N. Kurova⁵, N.E. Lyubimova⁵, R.S. Ferman⁵, G.N. Khamdulaeva⁵, I.V. Khamitova⁵, E.V. Khorkova⁵,
A.M. Milichkina⁵, V.G. Dedkov⁵, A.A. Totolian⁵

Assessment of the Herd Immunity to SARS-CoV-2 among the Population of the Leningrad Region during the COVID-19 Epidemic

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

²Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation;

³Rospotrebnadzor Administration in the Leningrad Region, St. Petersburg, Russian Federation;

⁴Center of Hygiene and Epidemiology in the Leningrad Region, St. Petersburg, Russian Federation;

⁵Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The first case of COVID-19 was registered in the Leningrad Region on March 13, 2020. The period of increasing intensity of the epidemic process lasted 8 weeks. One month after reaching the maximum incidence rate, a study was organized to determine seroprevalence to COVID-19 among the population of the Region. **Objective** of the study was to determine the level and structure of community immunity to SARS-CoV-2 virus in the population of the Leningrad Region in the period of intensive COVID-19 transmission. **Materials and methods.** The work was carried out within the framework of the Rospotrebnadzor project on assessment of community immunity to the SARS-CoV-2 virus in the population of the Russian Federation. The content of antibodies to SARS-CoV-2 was determined applying ELISA using a kit for the analysis of human serum or blood plasma for the presence of specific IgG to the nucleocapsid of the SARS-CoV-2 virus, manufactured by the State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology (Obolensk) in accordance with the instructions for use. **Results and discussion.** The study has showed that the herd immunity of the population of the Leningrad Region was 20.7 %. The maximum level has been established in children 1–6 years old (42.3 %) and people over 70 years old (29.0 %). The highest level of seropositivity, except for children and older people, was found among the unemployed (25.1 %). The lowest level of seroprevalence was detected in civil servants (12.8 %) and military personnel (16.7 %). It has been shown that the risk of infection increases by 1.5 times in case of contacts with COVID-19 patients. After exposure to COVID-19 virus, antibodies are produced in 82.1 % of the cases. In individuals with a positive PCR test result obtained earlier, antibodies are detected in 82.8 % of cases. The share of asymptomatic forms among seropositive residents of the Leningrad Region was 86.9 %. The results of assessing the herd immunity to SARS-CoV-2 in the population of the Leningrad Region indicate that during the period of intensive COVID-19 transmission, an average level of seroprevalence was formed. A significant proportion of asymptomatic forms of infection characterizes the high intensity of the latently developing epidemic process. The results obtained should be taken into account when organizing preventive measures, including vaccination, and predicting morbidity rates.

Key words: COVID-19, incidence, seroprevalence, asymptomatic infection, Coronavirus SARS-CoV-2.

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

Corresponding author: Vyacheslav S. Smirnov, e-mail: vssmi@mail.ru.

Citation: Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Historik O.A., Mosevich O.S., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Cherny M.A., Balabysheva N.S., Loginova I.S., Vladimirova O.S., Samoglyadova I.S., Vasev N.A., Rumyantseva S.V., Chupalova E.Yu., Selivanova G.V., Muraviova M.V., Timofeeva L.V., Khankishieva E.N., Tychevskaya V.D., Nikitenko N.D., Kostenitskaya T.I., Virkunen N.V., Klimkina I.M., Kuzmina T.M., Degtyarenko N.V., Bazunova A.I., Filippova L.A., Palchikova N.A., Kukshkin A.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Bogumilchik E.A., Voskresenskaya E.A., Drobyshevskaya V.G., Zueva E.V., Kokorina G.I., Kurova N.N., Lyubimova N.E., Ferman R.S., Khamdulayeva G.N., Khamitova I.V., Khorkova E.V., Milichkina A.M., Dedkov V.G., Totolian A.A. Assessment of the Herd Immunity to SARS-CoV-2 among the Population of the Leningrad Region during the COVID-19 Epidemic. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:114–123. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-114-123

Received 14.09.20. Accepted 16.09.20.

Popova A.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-5307>
 Lyalina L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9921-3505>
 Smirnov V.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2723-1496>
 Bogumilchik E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3181-4328>
 Voskresenskaya E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6380-1153>
 Kokorina G.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1973-3138>
 Kurova N.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4740-8567>
 Ferman R.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7661-3725>
 Dedkov V.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5500-0169>
 Totolian A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

В декабре 2019 г. появилась информация о новом заболевании, этиологическим фактором которого оказался β-коронавирус [1]. Решением Группы по изучению коронавируса (CSG) Международного комитета по таксономии вирусов новый вирус назван SARS-CoV-2 [2]. За короткое время инфекция, вызванная этим вирусом, распространилась практически на все страны мира, что позволило Генеральному директору ВОЗ 11 февраля 2020 г. объявить пандемию нового заболевания COVID-19 (coronavirus disease 2019) [3]. По данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, в Российской Федерации (РФ) по состоянию на середину июня заболели COVID-19 493657 человек, показатель заболеваемости составил 336,18 на 100 тыс. населения.

В Ленинградской области первый случай COVID-19 выявлен 13 марта 2020 г. Период нара-

тания интенсивности эпидемического процесса продолжался 8 недель. Максимальный уровень заболеваемости сохранялся с 9 по 21 мая 2020 г. (25,96 и 25,68 на 100 тыс. населения), после чего наблюдалось постепенное снижение. Указанная динамика развития эпидемического процесса инфекции, обусловленной SARS-CoV-2, и опубликованные данные о сроках формирования антител класса IgG к вирусу в течение 2–4 недель [4] послужили основанием для выбора оптимального срока проведения исследования по определению серопревалентности к COVID-19 среди населения Ленинградской области (рис. 1).

Как известно, адаптивный иммунитет может сформироваться либо в результате естественного заражения, либо после введения соответствующей вакцины. Поскольку вакцины против SARS-CoV-2 находятся в стадии разработки, популяционный иммуни-

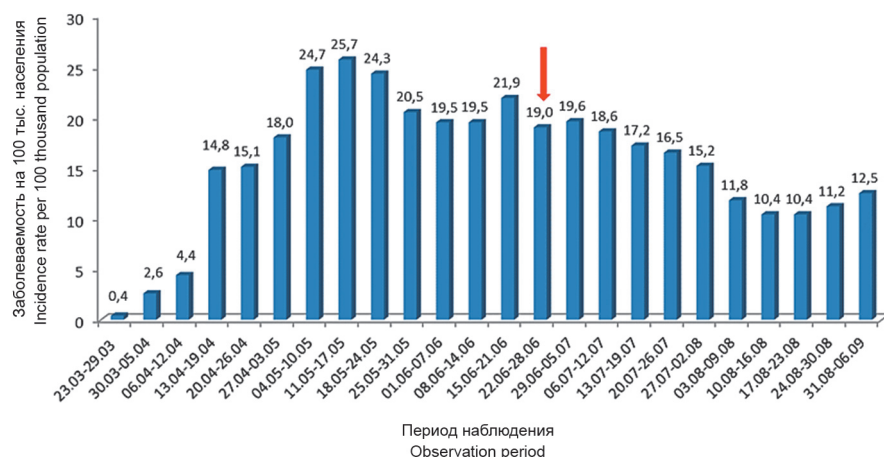


Рис. 1. Понедельная динамика заболеваемости COVID-19 жителей Ленинградской области. По оси ординат: заболеваемость на 100 тыс. населения. По оси абсцисс: недели наблюдения. Красной стрелкой отмечен период, в который проведены исследования на серопревалентность (с 23.06.2020 по 26.06.2020)

Fig. 1 Weekly dynamics of the COVID-19 incidence in residents of the Leningrad Region. Y-axis: incidence per 100,000 population. X-axis: weeks of observation. The red arrow marks the dates when tests for seroprevalence were carried out (June 23 – June 26, 2020)

тет на данном этапе может быть обусловлен исключительно спонтанным распространением COVID-19 среди населения. При этом у части лиц, имеющих высокую восприимчивость, SARS-CoV-2 может вызывать манифестную инфекцию, у других заболевание протекает бессимптомно и завершается только формированием адаптивного иммунитета (инаппарантная сероконверсия), у части наиболее резистентных лиц заболевание заканчивается бессимптомным носительством, не оставляющим гуморального ответа [5, 6]. Наконец, не следует исключать отмеченную вероятность перекрестного иммунитета, вызванного другими представителями β -коронавирусов человека (hCoV) [7].

Наличие иммунной прослойки населения имеет решающее значение для исхода любого массового заболевания. Известно, что в популяции, не имевшей анамнестического контакта с источником инфекции либо патогенами с большим или меньшим антигенным родством, возбудитель может неконтролируемо циркулировать среди восприимчивых лиц, вызывая у них манифестные формы инфекции. Если возбудитель к тому же достаточно контагиозен, как, например, все вирусы острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), то заболевание приобретает эпидемический характер и существует до того момента, пока количество переболевших не превысит число восприимчивых. Напротив, когда часть населения обладает иммунитетом, то эффективность контактов снижается и эпидемическая вспышка не развивается [8]. Точка, в которой доля восприимчивых людей становится ниже значения, определяющего вероятность распространения инфекции, известна как пороговый уровень иммунитета [7, 8].

Общепризнано, что пороговый уровень популяционного иммунитета для большинства инфекций составляет 60–70 % серопозитивных лиц. Применительно к COVID-19 существует некоторое противоречие. Так, в ряде работ указано, что оптимальный пороговый уровень иммунитета составляет 50–60 % [9, 10]. В то же время существует и иная точка зрения, что прерывание эпидемической вспышки COVID-19 может происходить и при более низком пороге, около 40 % [11]. Вероятно, значение

порогового уровня иммунитета может зависеть от особенностей жизни людей в современных условиях, интенсивности миграции, активности контактов и эффективности противоэпидемической защиты.

Целью проведенного сероэпидемиологического исследования, в связи с изложенным, стало определение уровня и структуры популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 среди населения Ленинградской области в период интенсивного распространения COVID-19.

Материалы и методы

Работа проводилась в рамках первого этапа широкомасштабного проекта Роспотребнадзора по оценке популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 у населения РФ с учетом протокола, рекомендованного ВОЗ [5]. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Перед началом исследования все участники или их юридические представители ознакомились с целью и методикой исследования и подписали информированное согласие.

Отбор добровольцев для исследования проводили методом анкетирования и случайной выборки. Критерием исключения явилась активная инфекция COVID-19 в момент анкетирования. Объем выборки определяли по формуле:

$$n = \frac{t^2 \cdot p(1-p)}{m^2},$$

где n – объем выборки;

t – уровень точности (для 95 % ДИ $t=1,96$);

p – оценочная распространенность изучаемого явления (в данном случае при 50 % $=0,5$);

m – допустимая ошибка – 5 % [12].

Расчет численности возрастной группы:

$$n = 1,96^2 \cdot 0,5(1 - 0,5) / 0,05^2 = 384 \text{ человека.}$$

По результатам анкетирования отобрано 3670 волонтеров, из них у 3173 человек отбирали пробы крови из вены для последующего исследования на наличие специфических антител к SARS-CoV-2. Всего протестировано на наличие антител 3130 человек.

Таблица 1 / Table 1

Серопревалентность у жителей Ленинградской области разных возрастных групп
 Seroprevalence among residents of the Leningrad Region of different age groups

Возрастная группа Age group	Число волонтеров в группе Number of volunteers in the age group	Серопозитивные Seropositive	Серонегативные Seronegative	Серопревалентность, %, (M±m) Seroprevalence, % (M ± m)
1–17 лет	401	108	293	26,9±2,2
В том числе: Including:	1–6	78	33	42,3±5,6
	7–13	169	44	26,0±3,4
	14–17	154	31	20,1±3,2
18–29	464	82	382	17,7±1,8
30–39	474	97	377	20,5±1,9
40–49	510	88	422	17,2±1,7
50–59	480	85	395	17,7±1,7
60–69	422	78	344	18,5±1,9
70 и старше 70 and above	379	110	269	29,0±2,3
Итого: Total:	3130	648	2482	20,7±0,7

По численности все возрастные группы являлись сопоставимыми и составили 379–510 волонтеров (табл. 1). Возраст обследованных добровольцев варьировал от 1 года до 70 лет и старше. Соотношение мужчин и женщин составило 27:73.

В связи с тем, что между Санкт-Петербургом и большинством районов Ленинградской области отмечается значительная миграция населения, особенно в период дачного сезона, при наборе волонтеров учитывали данные о регистрации, жители Санкт-Петербурга не включались в исследование, хотя они могли служить источниками передачи инфекции.

Из всей когорты волонтеров доля лиц с наличием в анамнезе верифицированного диагноза COVID-19 составила 2,1 % (67 чел.), лиц с признаками ОРВИ неуточненной этиологии в день обследования – 2,4 % (74 чел.).

Пробы крови волонтеров отбирали в вакутейнеры с ЭДТА, центрифугировали, после чего плазму отделяли от клеточных элементов, переносили в пластиковые пробирки и хранили до исследования при температуре 4 °C. Содержание антител к SARS-CoV-2 определяли методом ИФА с использованием набора реагентов для анализа сыворотки или плазмы крови человека на наличие специфических иммуноглобулинов класса G к нуклеокапсиду вируса SARS-CoV-2 производства Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболensk). Результаты учитывали качественным методом и считали положительными при превышении уровня cut-off.

Статистическую обработку проводили с использованием методов вариационной статистики с помощью статистического пакета Excel и программного продукта WinPeri (версия 11.65). Наличие связи между уровнем заболеваемости COVID-19 и серопревалентностью рассчитывали по методу ранговой корреляции Спирмена. Для оценки достоверности

различий сравниваемых показателей использовали уровень вероятности $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Возрастное и географическое распределение серопревалентности среди населения Ленинградской области. Серопревалентность среди жителей Ленинградской области в целом составила (20,7±0,7) % – 648/3130, это ниже по сравнению с данными по Санкт-Петербургу (26,0±1,7) %, различия статистически значимы ($p < 0,05$). По возрастным группам показатели серопревалентности варьировали в диапазоне от (17,3±3,3) до (29,0±4,6) % (табл. 1). Максимальный уровень серопревалентности выявлен в детской (преимущественно за счет подгруппы 1–6 лет) и старшей (70 лет и более) возрастных группах. Некоторое увеличение сероконверсии в старшей возрастной группе можно объяснить перекрестным иммунитетом к ранее перенесенным ОРВИ, вызванным другими низковирулентными β НСоV [9]. Сложнее понять достоверно ($p < 0,05$) более высокую серопревалентность в детской возрастной группе (1–17 лет) по сравнению с сероконверсией у лиц среднего и старшего возрастов (18–29, 40–49 и 50–59 лет). По-видимому, этот факт требует дополнительного исследования.

Серопревалентность не имела статистически значимых гендерных различий и составила (21,6±1,4) % у мужчин и (20,4±0,8) % у женщин.

При анализе распределения серопревалентности среди жителей разных районов Ленинградской области выявлено заметное варьирование этого показателя (табл. 2). Минимальная частота сероконверсии отмечена в Волховском и Выборгском районах (13,58 и 14,92 % соответственно), максимальная – в Приозерском и Гатчинском районах (36,24 и 31,16 % соответственно), различия статистически значимы

Таблица 2 / Table 2

Уровень серопревалентности и заболеваемости среди жителей разных районов Ленинградской области
The level of seroprevalence and morbidity rates among residents of different districts of the Leningrad Region

Район District	Число обследованных, чел. Number of examined persons	В том числе: Including:		Серопревалентность, % (M±m) Seroprevalence, % (M ± m)	Заболеваемость, ‰ ₀₀₀₀ Morbidity, ‰ ₀₀₀₀
		серопозитивные seropositive	серонегативные seronegative		
Бокситогорский Boksitogorsky	179	37	142	20,67±3,02	230,33
Волосовский Volosovsky	201	47	154	23,38±2,98	276,18
Волховский Volkhovsky	162	22	140	13,58±2,69	69,16
Всеволожский Vsevolozhsky	211	41	170	19,43±2,72	191,52
Выборгский Vyborgsky	201	30	171	14,92±2,51	189,18
Гатчинский Gatchinsky	199	62	137	31,16±3,28	558,32
Кингисепский Kingisepsky	187	40	147	21,39±2,99	145,56
Киришский Kirishsky	180	31	149	17,22±2,81	250,51
Кировский Kirovsky	204	46	158	22,55±2,93	173,56
Ломоносовский Lomonosovsky	212	36	176	16,98±2,58	71,35
Лодейнопольский Lodeynopolsky	171	31	140	22,14±3,18	179,72
Лужский Luzhsky	158	33	125	20,89±3,23	80,52
Приозерский Priozersky	149	54	95	36,24±3,94	90,29
Подпорожский Podporozhsky	145	26	119	17,93±3,18	220,38
Сланцевский Slantsevsky	171	40	131	23,39±3,24	127,67
Тихвинский Tikhvinsky	208	43	165	20,67±2,81	205,88
Тосненский Tosnensky	192	29	163	15,10±2,58	149,71
Итого: Total:	3130	648	2482	20,70±0,72	224,93

($p < 0,05$). Более высокие показатели серопревалентности в этих районах могут быть связаны с тесными социальными и производственными контактами населения Санкт-Петербурга и указанных территорий.

Влияние факторов риска на структуру серопревалентности. При учете того, что профессиональная структура населения может оказать определенное влияние как на темпы распространения возбудителя, так и скорость формирования коллективного иммунитета [13], проведен анализ уровня серопревалентности в различных социально-профессиональных группах (табл. 3).

Результаты исследования показали, что социально-профессиональные факторы оказывают отчетливое влияние на уровень серопревалентности,

хотя и не всегда понятное (табл. 3). Так, среди детей показатель сероконверсии являлся максимальным и достиг 3 %, что вполне соответствует возрастному распределению серопревалентности (табл. 1). С другой стороны, можно было ожидать значительного уровня иммунитета к SARS-CoV-2 среди медицинских работников, поскольку многие из них могли иметь профессиональный контакт с больными COVID-19. Однако это предположение не подтвердилось. Среди работников медицинских учреждений отмечен средний уровень серопревалентности (18,4±1,47) %. Высокая частота сероконверсии у безработных (25,09±1,88) %, напротив, вполне понятна, если предположить, что эти лица в меньшей степени привержены соблюдению надлежащего

Таблица 3 / Table 3

Влияние социально-профессиональных факторов на структуру серопревалентности среди населения Ленинградской области

Impact of socio-professional factors on the structure of seroprevalence among the population of the Leningrad Region

Вид деятельности Type of activity	Объем группы, человек Group size, people	В том числе Including		Серопревалентность, % (M±m) Seroprevalence, % (M ± m)
		серопозитивные seropositive	серонегативные seronegative	
Медицина Medicine	689	125	564	18,14±1,47
Наука Science	27	6	21	22,22±8,00
Бизнес Business sector	96	21	75	21,87±4,22
Образование Education	311	58	252	18,65±2,21
Творчество Art and craft	50	11	39	22,00±5,86
Производство Industry	293	54	239	18,43±2,26
Транспорт Transport	75	12	63	16,00±4,23
Военная служба Military service	12	2	11	16,67±10,76
Гос. служба Civil service	180	23	157	12,78±2,49
Офис Office work	255	43	212	16,86±2,34
Безработные Unemployed	530	133	397	25,09±1,88
Дети Children	319	96	223	30,09±2,57
Прочее Other	293	64	229	21,84±2,41
Итого: Total:	3130	648	2482	20,70±0,72

противоэпидемического режима. Некоторый свет на эту проблему проливает анализ частоты выявления антител в зависимости от наличия контактов с больными COVID-19. Так, в группе лиц, не контактировавших с больными, доля сероположительных составила (19,0±1,7) %, а при наличии таких контактов этот показатель возрастал в 1,5 раза – (28,9±4,6) %, что практически близко к частоте сероконверсии у безработных и детей.

Уровень серопозитивности у лиц, переболевших или имевших контакт с больными COVID-19. Особенностью COVID-19 является значительная гетерогенность антительного ответа как в процессе заболевания, так и в период реконвалесценции [14], причем далеко не всегда удается связать серопозитивность реконвалесцента с тяжестью перенесенного заболевания и продолжительностью постинфекционного анамнеза. Между тем уровень адаптивного иммунитета к COVID-19 имеет существенное значение с точки зрения планирования противоэпидемических мероприятий. При обследовании лиц, никогда не имевших явного контакта с больными COVID-19, доля серопозитивных составила (19,72±0,79) % (495

серопозитивных из 2510 обследованных). Из 530 лиц, контактировавших с больными COVID-19, количество серопозитивных составило 153 человека – (28,87±1,97) %, причем контакт не сопровождался развитием каких-либо клинических проявлений заболевания, что можно трактовать как инаппарантную сероконверсию. Стоит также отметить, что уровень подобной сероконверсии среди контактных лиц в Ленинградской области оказался в 1,5 раза ниже, чем в Санкт-Петербурге [5].

Одной из важных задач явилось изучение связи между серопревалентностью и результатами определения РНК вируса SARS-CoV-2 в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Всего обследовано 481 ПЦР-негативный и 64 ПЦР-позитивных волонтера. Как и следовало ожидать, среди ПЦР-негативных волонтеров серопревалентных выявлено 132 человека – (27,44±2,04) %, тогда как среди ПЦР-позитивных волонтеров сероконверсия отмечена у 53 человек – (82,81±4,72) %. Данные результаты свидетельствуют о двух параллельных тенденциях: уровень серопревалентности у ПЦР-негативных добровольцев близок к среднепопуляционному (20,7±0,7), тогда как

обнаружение РНК вируса в ПЦР закономерно сопровождалось развитием адаптивного иммунитета и соответственно ростом числа серопозитивных лиц.

SARS-CoV-2 относится к большой группе коронавирусов, среди которых встречаются низкопатогенные представители, вызывающие сезонные ОРВИ и способные формировать перекрестный иммунитет [15]. В связи с этим представляла определенный интерес оценка наличия серопревалентности у больных ОРВИ неуточненной этиологии. Обследованная выборка включала 74 волонтера, у 25 из них выявлены антитела к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 (33,8 %). Поскольку детальной расшифровки возбудителей ОРВИ не проводилось, нельзя исключить того, что у части из них серопревалентность могла быть обусловлена перекрестным иммунитетом к другим штаммам вируса. Это может быть предметом для дальнейшего углубленного исследования.

Оценка доли бессимптомных форм. Для расчета распространенности бессимптомных форм среди серопозитивных лиц вычисляли долю лиц, у которых отсутствует хотя бы один признак: диагноз COVID-19, положительная ПЦР или признаки ОРВИ. При обследовании 648 серопозитивных волонтеров выявлено 563 человека с бессимптомным течением, что составило $(86,9 \pm 1,3) \%$. Указанное значение практически полностью совпадает с аналогичным показателем у жителей Санкт-Петербурга [5]. Доля лиц с бессимптомным течением инфекции варьировала от $(80,8 \pm 4,5) \%$ в возрастной группе 60–69 лет до $(92,6 \pm 2,5) \%$ в возрастной группе 1–17 лет. В остальных группах она варьировала в пределах $(89,8 \pm 3,4 - 82,4 \pm 4,1) \%$. Каких-либо достоверных межгрупповых различий в этой серии исследований не выявлено.

Проведенное обследование жителей Ленинградской области убедительно показало, что популяционный уровень сероконверсии к SARS-CoV-2 составил $(20,7 \pm 0,7) \%$. Этот показатель близок по величине, хотя и неравнозначен таковому среди жителей Санкт-Петербурга – $(26,0 \pm 1,7) \%$ [5]. Вероятно, данные различия в серопревалентности до некоторой степени можно объяснить имеющимися демографическими особенностями региона. Так, численность населения в Ленинградской области в 2,7 раза меньше, чем в Санкт-Петербурге, а удельная плотность населения в Санкт-Петербурге в 178 раз выше. Отсюда следует, что вероятность контактов между горожанами достоверно выше, чем между жителями области.

При анализе возрастной структуры серопревалентности обращает на себя внимание высокая частота сероконверсии у детей $(26,9 \pm 2,2) \%$ и лиц в возрасте 70 лет и старше $(29,0 \pm 2,3) \%$ относительно среднепопуляционного уровня $(20,7 \pm 0,7) \%$, причем в обеих группах эти различия статистически достоверны ($p < 0,05$). Полученные результаты не дают оснований для объяснения большей серопревалентности среди детей, что же касается когорты 70 лет и старше, то не исключено, что высокая сероконверсия

могла быть результатом перекрестного иммунитета к другим β НСоV [15]. В связи с этим исследование анамнестической серопревалентности к слабопатогенным штаммам β НСоV могло бы помочь в уточнении природы популяционного иммунитета.

Что касается распределения серопревалентности по районам Ленинградской области (рис. 2), то самый низкий уровень отмечен в Волховском районе – $(13,58 \pm 2,69) \%$, а самый высокий в Приозерском – $(36,24 \pm 3,94) \%$ ($p < 0,05$).

Анализ возможных причин имеющихся различий серопревалентности по районам показал, что Волховский район по площади в 1,4 раза больше, а по плотности населения сопоставим с Приозерским районом (17,21 и 16,78 чел./км² соответственно). Объемы выборки также сопоставимы и составили 162 человека в Волховском районе и 149 – в Приозерском, тогда как уровень серопревалентности различался в 2,7 раза. Проведена оценка связи между уровнем серопревалентности и численностью населения в районах Ленинградской области (табл. 2) методом ранговой корреляции Спирмена. При этом значение коэффициента корреляции составило 0,226; критическое значение – 0,485; уровень достоверности $p > 0,10$. Корреляционная связь между численностью населения и уровнем серопревалентности не выявлена. Можно предположить, что различия в серопревалентности могут быть связаны с интенсивностью миграционных процессов и контактов между жителями этих районов и мегаполиса – Санкт-Петербурга.

Еще одной причиной высокой или низкой сероконверсии мог быть уровень заболеваемости на той или иной территории. Для проверки этой гипотезы проанализировали распределение заболеваемости и серопревалентности во всех районах Ленинградской области. При этом отмечена слабая, но достоверная связь между сравниваемыми показателями (рис. 3). Данная зависимость вполне объективна и хорошо укладывается в особенности эпидемического процесса [16]. Повышение уровня заболеваемости неизбежно сопровождается увеличением вероятности передачи вируса здоровым субъектам [8]. В свою очередь высокий уровень носительства и инаппарантной сероконверсии может быть причиной роста серопревалентности, что, вероятно, и отражает выявленная достоверная корреляционная связь ($r = 0,5128$, $p < 0,05$) между изучаемыми явлениями.

Что касается особенностей сероконверсии у лиц разных социальных групп, то наибольшая частота отмечена у детей и безработных. Касаясь последней группы, можно предположить, что это связано с низким уровнем соблюдения противоэпидемических правил, что, впрочем, не привело к каким-то катастрофическим последствиям, возможно, из-за высокой распространенности бессимптомных форм инфекции и активного формирования инаппарантной сероконверсии.

Резюмируя изложенное, можно отметить, что

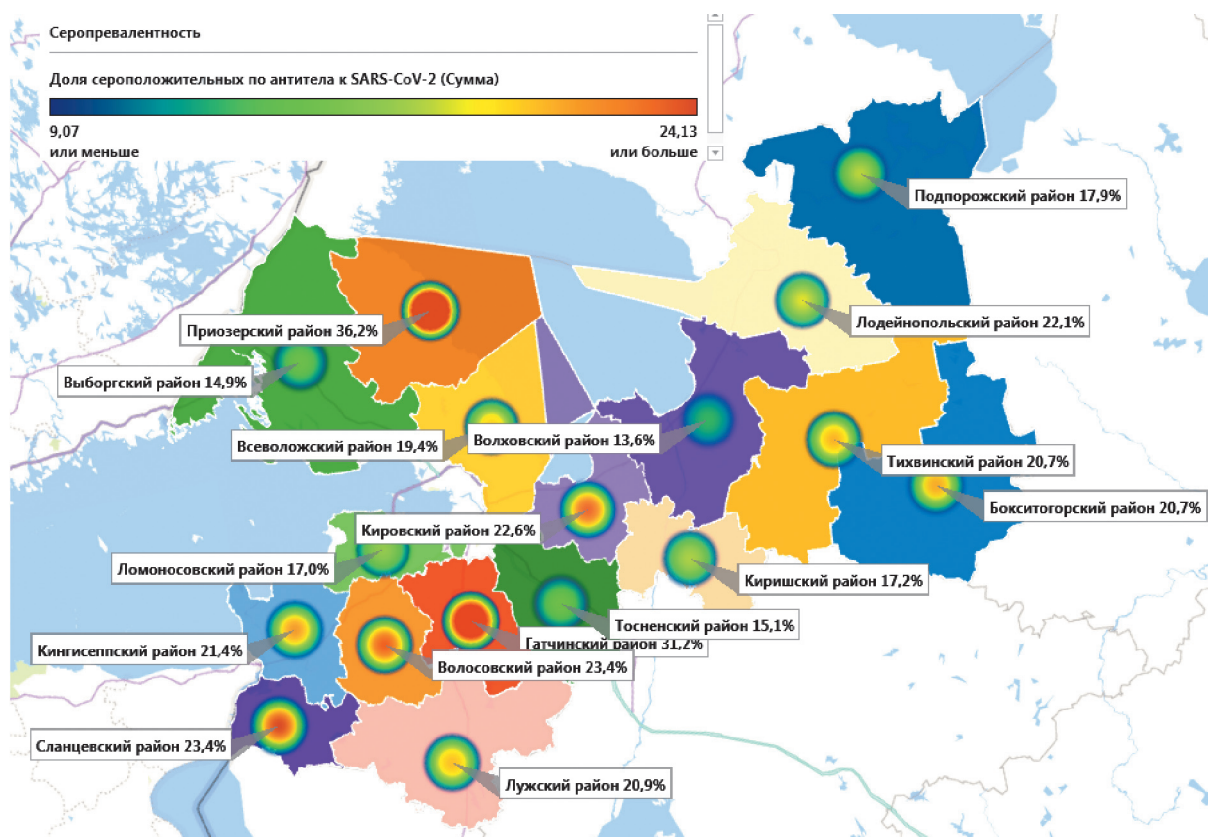


Рис. 2. Доля серопозитивных к SARS-CoV-2 в 17 районах Ленинградской области (15–19 июня 2020 г.)

Примечания: уровень серопревалентности в каждом районе изображен в виде термодиска, размещенного в центре географического контура каждого района. Термощкала приведена слева сверху.

Fig. 2. The share of those who are seropositive to SARS-CoV-2 in 17 districts of the Leningrad Region (June 15–19, 2020)

Note: The seroprevalence level in each area is depicted as a thermal disk located in the center of the geographic outline of each area. The thermal scale is shown in the top left corner.

заболеваемость COVID-19 в Ленинградской области сопровождается умеренной серопревалентностью к вирусу SARS-CoV-2 с одновременной высокой частотой (до 90 %) случаев инapparантных форм течения инфекционного процесса. Отсутствие явных симптомов заболевания не позволяет с достаточной степенью достоверности оценить реальное распро-

странение инфекции и сроки формирования стойкого популяционного иммунитета. Более убедительные данные можно получить после динамического наблюдения за сформированной когортой в течение не менее одного года. Результаты исследования показали, что после перенесенного заболевания у 18 % лиц антитела к вирусу SARS-CoV-2 не выявляются. Значительная доля бессимптомных форм инфекции COVID-19 характеризует высокую интенсивность эпидемического процесса. Полученные результаты необходимо учитывать при организации профилактических мероприятий, включая вакцинацию, и прогнозировании заболеваемости.

Таким образом, коллективный иммунитет совокупного населения Ленинградской области составил 20,7 %, максимальный уровень коллективного иммунитета установлен у детей 1–6 лет (42,3 %) и у пожилых старше 70 лет (29,0 %). При этом наибольший уровень серопозитивности, кроме детей и лиц старшего возраста, выявлен у безработных (25,1 %), наименьший – в подгруппе госслужащих (12,8 %). При наличии контактов с больными COVID-19 вероятность сероконверсии увеличивается примерно в 1,5 раза. Установлена достоверная связь между заболеваемостью и серопревалентностью в районах Ленинградской области. После инфекции COVID-19 антитела в плазме крови обнаруживаются в 82,1 %

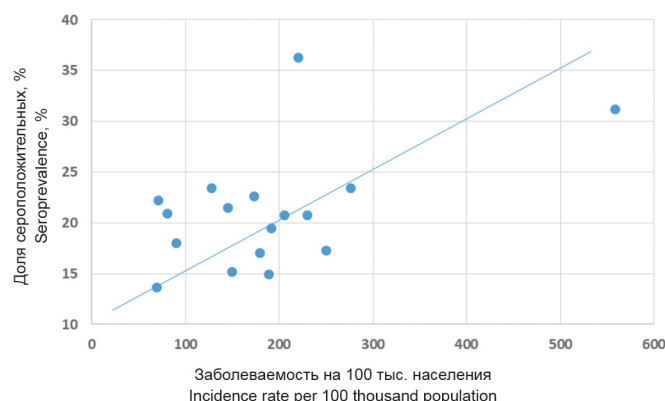


Рис. 3. Связь между уровнями заболеваемости и серопревалентности среди населения Ленинградской области. Значение коэффициента корреляции ($r = 0,5128$, $p < 0,05$). Линия тенденции рассчитана методом регрессионного анализа

Fig. 3. The relation between the levels of morbidity and seroprevalence among the population of the Leningrad Region. Correlation coefficient value ($r = 0,5128$, $p < 0,05$). The trend line was calculated using regression analysis

случаев. У лиц с позитивным результатом ПЦР-анализа, полученным ранее, антитела выявляются в 82,8 % случаев. Среди серопозитивных к вирусу SARS-CoV-2 жителей Ленинградской области доля бессимптомных форм инфекции составила 86,9 %.

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

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера за помощь при организации и проведении исследования: Гужиной Т.В., Кондаурову С.В., Пирумову Д.Р., Ракитянской Н.В., Румянцевой Л.Г., Чубаровой Н.И.

Список литературы

- Xu X., Chen P., Wang J., J. Feng, Zhou H., Li X., Zhong W., Hao P. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China. Life Sci.* 2020; 63:457–60. DOI: 10.1007/s11427-020-1637-5.
- Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., de Groot R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A., Haagmans B.L., Lauber C., Leontovich A.M., Neuman B.W., Penzar D., Perlman S., Poon L.L.M., Samborskiy D., Sidorov I.A., Sola I., Ziebuhr J. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: the species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. *BioRxiv.* 2020; DOI: 10.1101/2020.02.07.937862.
- WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>. (дата обращения 29.06.2020).
- Clemente-Suárez V.J., Hormeño-Holgado A., Jiménez M., Benítez-Agudelo J.C., Navarro-Jiménez E., Perez-Palencia N., Maestre-Serrano R., Laborde-Cárdenas C.C., Tornero-Aguilera J.F. Dynamics of population immunity due to the herd effect in the COVID-19 pandemic. *Vaccines* (Basel). 2020; 8(2):E236. DOI: 10.3390/vaccines8020236.
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Фридман Р.К., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Чхинджерия И.Г., Гречанинова Т.А., Агапов К.А., Арсентьева Н.А., Баженова Н.А., Бацунов О.К., Данилова Е.М., Зуева Е.В., Комкова Д.В., Кузнецова Р.Н., Любимова Н.Е., Маркова А.Н., Хамитова И.В., Ветров В.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тотолян А.А. Популяционный иммунитет к вирусу SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в активную фазу эпидемии COVID-19. *COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU.* 2020.07.28. [Электронный ресурс]. DOI: 10.21055/preprints-3111752.
- García L.F. Immune response, inflammation, and the clinical spectrum of COVID-19. *Front. Immunol.* 2020; 11:1441. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01441.
- Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd immunity: understanding COVID-19. *Immunity.* 2020; 52(5):737–41. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.04.012.
- Anderson R.M., May R.M. Vaccination and herd immunity to infectious diseases. *Nature.* 1985; 318:323–9. DOI: 10.1038/318323a0.
- Kwok K.O., Lai F., Wei W.I., Wong S.Y.S., Tang J.W.T. Herd immunity – estimating the level required to halt the COVID-19 epidemics in affected countries. *J. Infect.* 2020; 80(6):e32–e33. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.03.027.
- Papachristodoulou E., Kakoullis L., Parperis K., Panos G. Long-term and herd immunity against SARS-CoV-2: implications from current and past knowledge. *Pathog. Dis.* 2020; 78(3):ftaa025. DOI: 10.1093/femspd/ftaa025.
- Britton T., Ball F., Trapman P. A mathematical model reveals the influence of population heterogeneity on herd immunity to SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 369(6505):846–9. DOI: 10.1126/science.abc6810.
- Newcombe R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Statistics in Medicine.* 1998; 17:857–87. DOI: 10.1002/(sici)1097-0258(19980430)17:8<857::aid-sim777>3.0.co;2-e.
- Raboisson D., Lhermie G. Living with COVID-19: A systemic and multi-criteria approach to enact evidence-based health policy. *Front. Public Health.* 2020; 8:294. DOI: 10.3389/fpubh.2020.00294.
- Hou H., Wang T., Zhang B., Luo Y., Mao L., Wang F., Wu S., Sun Z. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Transl. Immunology.* 2020; 9(5):e01136. DOI: 10.1002/cti2.1136.
- Ng K.W., Faulkner N., Cornish G.H., Rosa A., Harvey R., Hussain S., Ulferts R., Earl C., Wrobel A., Benton D., Roustan C., Bolland W., Thompson R., Agua-Doce A., Hobson P., Heaney J., Rickman H., Paraskevopoulou S., Houlihan C.F., Thomson K., Sanchez E., Brealey D., Shin G.Y., Spyer M.J., Joshi D., O'Reilly N., Walker P.A., Kjaer S., Riddell A., Moore C., Jebson B.R., Wilkinson M.G.L., Marshall L.R., Rosser E.C., Radziszewska A., Peckham H., Ciurtin C., Wedderburn L.R., Beale R., Swanton C., Gandhi S., Stockinger B., McCauley J., Gambin S., McCoy L.E., Cherepanov P., Nastouli E., Kassiotis G. Pre-existing and *de novo* humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *BioRxiv.* 2020. 095414; DOI: 10.1101/2020.05.14.095414.
- Paudel S., Dhangal G., Chalise A., Bhandari T.R., Dhangal O. The Coronavirus Pandemic: What does the evidence show? *J. Nepal Health Res. Counc.* 2020; 18(46):1–9. DOI: 10.33314/jnhrc.v18i4.2596.

References

- Xu X., Chen P., Wang J., J. Feng, Zhou H., Li X., Zhong W., Hao P. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China. Life Sci.* 2020; 63:457–60. DOI: 10.1007/s11427-020-1637-5.
- Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., de Groot R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A., Haagmans B.L., Lauber C., Leontovich A.M., Neuman B.W., Penzar D., Perlman S., Poon L.L.M., Samborskiy D., Sidorov I.A., Sola I., Ziebuhr J. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: the species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. *BioRxiv.* 2020; DOI: 10.1101/2020.02.07.937862.
- WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. (Cited 29 June 2020). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>.
- Clemente-Suárez V.J., Hormeño-Holgado A., Jiménez M., Benítez-Agudelo J.C., Navarro-Jiménez E., Perez-Palencia N., Maestre-Serrano R., Laborde-Cárdenas C.C., Tornero-Aguilera J.F. Dynamics of population immunity due to the herd effect in the COVID-19 pandemic. *Vaccines* (Basel). 2020; 8(2):E236. DOI: 10.3390/vaccines8020236.
- Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Bashketova N.S., Fridman R.K., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Chkhindzheriya I.G., Grechaninova T.A., Agapov K.A., Arsentyeva N.A., Bazhenova N.A., Batsunov O.K., Danilova E.M., Zueva E.V., Komkova D.V., Kuznetsova R.N., Lyubimova N.E., Markova A.N., Khamitova I.V., Milichkina A.M., Dedkov V.G., Totolyan A.A. [Population immunity to the SARS-CoV-2 virus among the population of St. Petersburg in the active phase of the COVID-19 epidemic]. *COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU.* 28 July 2020. [Internet]. DOI: 10.21055/preprints-3111752.
- García L.F. Immune response, inflammation, and the clinical spectrum of COVID-19. *Front. Immunol.* 2020; 11:1441. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01441.
- Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd immunity: understanding COVID-19. *Immunity.* 2020; 52(5):737–41. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.04.012.
- Anderson R.M., May R.M. Vaccination and herd immunity to infectious diseases. *Nature.* 1985; 318:323–9. DOI: 10.1038/318323a0.
- Kwok K.O., Lai F., Wei W.I., Wong S.Y.S., Tang J.W.T. Herd immunity – estimating the level required to halt the COVID-19 epidemics in affected countries. *J. Infect.* 2020; 80(6):e32–e33. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.03.027.
- Papachristodoulou E., Kakoullis L., Parperis K., Panos G. Long-term and herd immunity against SARS-CoV-2: implications from current and past knowledge. *Pathog. Dis.* 2020; 78(3):ftaa025. DOI: 10.1093/femspd/ftaa025.
- Britton T., Ball F., Trapman P. A mathematical model reveals the influence of population heterogeneity on herd immunity to SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 369(6505):846–9. DOI: 10.1126/science.abc6810.
- Newcombe R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Statistics in Medicine.* 1998; 17:857–87. DOI: 10.1002/(sici)1097-0258(19980430)17:8<857::aid-sim777>3.0.co;2-e.
- Raboisson D., Lhermie G. Living with COVID-19: A systemic and multi-criteria approach to enact evidence-based health policy. *Front. Public Health.* 2020; 8:294. DOI: 10.3389/fpubh.2020.00294.
- Hou H., Wang T., Zhang B., Luo Y., Mao L., Wang F., Wu S., Sun Z. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Transl. Immunology.* 2020; 9(5):e01136. DOI: 10.1002/cti2.1136.

DOI: 10.1002/cti2.1136.

15. Ng K.W., Faulkner N., Cornish G.H., Rosa A., Harvey R., Hussain S., Ulferts R., Earl C., Wrobel A., Benton D., Rouston C., Bolland W., Thompson R., Agua-Doce A., Hobson P., Heaney J., Rickman H., Paraskevopoulou S., Houlihan C.F., Thomson K., Sanchez E., Brealey D., Shin G.Y., Spyer M.J., Joshi D., O'Reilly N., Walker P.A., Kjaer S., Riddell A., Moore C., Jebson B.R., Wilkinson M.G.L., Marshall L.R., Rosser E.C., Radziszewska A., Peckham H., Ciurtin C., Wedderburn L.R., Beale R., Swanton C., Gandhi S., Stockinger B., McCauley J., Gambin S., McCoy L.E., Cherepanov P., Nastouli E., Kassiotis G. Pre-existing and *de novo* humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *BioRxiv*. 2020. 095414; DOI: 10.1101/2020.05.14.095414.

16. Paudel S., Dhangal G., Chalise A., Bhandari T.R., Dhangal O. The Coronavirus Pandemic: What does the evidence show? *J. Nepal Health Res. Counc.* 2020; 18(46):1–9. DOI: 10.33314/jnhrc.v18i1.2596.

Authors:

Popova A.Yu. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare; 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation. Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation.

Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation.

Historik O.A., Cherny M.A., Balabyшева N.S., Loginova I.S., Vladimirova O.S., Samoglyadova I.S., Vasev N.A., Romyantseva S.V., Chupalova E.Yu., Selivanova G.V., Muraviova M.V., Timofeeva L.V., Khankishieva E.N., Tylchevskaya V.D., Nikitenko N.D., Kostenitskaya T.I., Virkunen N.V. Rospotrebnadzor Administration in the Leningrad Region. 27, Ol'minskogo St., St. Petersburg, 192029, Russian Federation. E-mail: lenobl@47.rospotrebnadzor.ru.

Mosevich O.S., Smirnov V.S., Klimkina I.M., Kuzmina T.M., Degtyarenko N.V., Bazunova A.I., Filippova L.A., Palchikova N.A., Kukshkin A.V. Center of Hygiene and Epidemiology in the Leningrad Region. 27, Ol'minskogo St., St. Petersburg, 192029, Russian Federation. E-mail:

secretary@cge47.ru.

Lyalina L.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Bogumilchik E.A., Voskresenskaya E.A., Drobyshevskaya V.G., Zueva E.V., Kokorina G.I., Kurova N.N., Lyubimova N.E., Ferman R.S., Khamdulaeva G.N., Khamitova I.V., Khorkova E.V., Milichkina A.M., Dedkov V.G., Totolian A.A. Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 14, Mira St., St. Petersburg, 197101, Russian Federation. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Об авторах:

Попова А.Ю. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7. Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования; Российская Федерация, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.

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

Историк О.А., Черный М.А., Балабышева Н.С., Логинова И.С., Владимирова О.С., Самоглыдова И.С., Васев Н.А., Румянцев С.В., Чупалова Е.Ю., Селиванова Г.В., Муравьева М.В., Тимофеева Л.В., Ханкишиева Э.Н., Тылчевская В.Д., Никитенко Н.Д., Костеницкая Т.И., Виркунен Н.В. Управление Роспотребнадзора по Ленинградской области. Российская Федерация, 192029, Санкт-Петербург, ул. Ольминского, 27. E-mail: lenobl@47.rospotrebnadzor.ru.

Мосевич О.С., Климкина И.М., Кузьмина Т.М., Дегтяренко Н.В., Базунова А.И., Филиппова Л.А., Пальчикова Н.А., Кукишкин А.В. Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области. Российская Федерация, 192029, Санкт-Петербург, ул. Ольминского, 27. E-mail: secretary@cge47.ru.

Лялина Л.В., Смирнов В.С., Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Богумильчик Е.А., Воскресенская Е.А., Дробышевская В.Г., Зуева Е.В., Кокорина Г.И., Курова Н.Н., Любимова Н.Е., Ферман Р.С., Хамдулаева Г.Н., Хамитова И.В., Хорькова Е.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тотолян А.А. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-124-130

УДК 616.98:578.2

А.Ю. Попова^{1,2}, Е.Б. Ежлова¹, А.А. Мельникова¹, Н.С. Башкетова³, Р.К. Фридман⁴, Л.В. Лялина⁵,
В.С. Смирнов⁵, И.Г. Чхинджерия³, Т.А. Гречанинова⁴, К.А. Агапов⁴, Н.А. Арсентьева⁵, Н.А. Баженова⁵,
О.К. Бацунов⁵, Е.М. Данилова⁵, Е.В. Зуева⁵, Д.В. Комкова⁵, Р.Н. Кузнецова⁵, Н.Е. Любимова⁵,
А.Н. Маркова⁵, И.В. Хамитова⁵, В.И. Ломоносова⁵, В.В. Ветров⁵, А.М. Миличкина⁵, В.Г. Дедков⁵,
А.А. Тотолян⁵

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ К SARS-COV-2 СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА В ПЕРИОД ЭПИДЕМИИ COVID-19

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

²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Российская Федерация;

³Управление Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Российская Федерация; ⁴ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ⁵ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация

В Санкт-Петербурге первый случай COVID-19 диагностирован 2 марта 2020 г., период нарастания заболеваемости продолжался в течение 10 недель, максимальные показатели зафиксированы в середине мая, и в дальнейшем отмечалось статистически значимое снижение заболеваемости. **Цель** – определение уровня и структуры популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период интенсивного распространения COVID-19. **Материалы и методы.** Отбор волонтеров для исследования проводили методом анкетирования и рандомизации. Критерием исключения являлась активная инфекция COVID-19 в момент анкетирования. На наличие специфических антител к SARS-CoV-2 обследовано 2713 человек в возрасте от 1 года до 70 лет и старше. Антитела определяли иммуноферментным методом. **Результаты и обсуждение.** Исследования показали, что в Санкт-Петербурге в активную фазу заболеваемости COVID-19 наблюдались умеренная серопревалентность к SARS-CoV-2, составившая 26 %, и высокая частота (84,5 %) бессимптомной инфекции у серопозитивных лиц, не имевших в анамнезе перенесенного заболевания COVID-19, положительного результата ПЦР и симптомов ОРЗ в день обследования. Максимальные показатели коллективного иммунитета установлены у детей 1–6 лет (31,1 %), 7–13 лет (37,7 %) и лиц старше 70 лет (30,4 %). Различия с уровнем серопревалентности в возрастных группах 18–49 лет статистически значимы. Наибольший уровень серопревалентности выявлен среди безработных (29,7 %), работников здравоохранения (27,1 %), образования (26,4 %) и бизнеса (25 %). У реконвалесцентов COVID-19 антитела обнаружены в 75 % случаев. У лиц с позитивным результатом ПЦР-анализа, проведенного ранее, антитела выявлены в 70 % случаев. Результаты исследования коллективного иммунитета к SARS-CoV-2 необходимы для разработки прогноза развития эпидемиологической ситуации, а также для планирования мероприятий по специфической и неспецифической профилактике COVID-19.

Ключевые слова: коронавирус SARS-CoV-2, COVID-19, серопревалентность, заболеваемость, бессимптомная инфекция.

Корреспондирующий автор: Смирнов Вячеслав Сергеевич, e-mail: vssmi@mail.ru.

Для цитирования: Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Фридман Р.К., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Чхинджерия И.Г., Гречанинова Т.А., Агапов К.А., Арсентьева Н.А., Баженова Н.А., Бацунов О.К., Данилова Е.М., Зуева Е.В., Комкова Д.В., Кузнецова Р.Н., Любимова Н.Е., Маркова А.Н., Хамитова И.В., Ломоносова В.И., Ветров В.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тотолян А.А. Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период эпидемии COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:124–130. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-124-130

Поступила 21.09.20. Принята к публ. 23.09.20.

A.Yu. Popova^{1,2}, E.B. Ezhlova¹, A.A. Mel'nikova¹, N.S. Bashketova³, R.K. Fridman⁴, L.V. Lyalina⁵,
V.S. Smirnov⁵, I.G. Chkhindzheriya³, T.A. Grechaninova⁴, K.A. Agapov⁴, N.A. Arsent'eva⁵,
N.A. Bazhenova⁵, O.K. Batsunov⁵, E.M. Danilova⁵, E.V. Zueva⁵, D.V. Komkova⁵, R.N. Kuznetsova⁵,
N.E. Lyubimova⁵, A.N. Markova⁵, I.V. Khamitova⁵, V.I. Lomonosova⁵, V.V. Vetrov⁵, A.M. Milichkina⁵,
V.G. Dedkov⁵, A.A. Totolyan⁵

Herd Immunity to SARS-CoV-2 among the Population in Saint-Petersburg during the COVID-19 Epidemic

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

²Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation;

³Rospotrebnadzor Administration in Saint-Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation;

⁴Center of Hygiene and Epidemiology in Saint-Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation;

⁵Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The first case of COVID-19 was diagnosed in St. Petersburg on March 2, 2020; the period of increase in the incidence lasted for 10 weeks, the maximum rates were recorded in mid-May, and subsequently there was a statistically significant decrease in the incidence. **Objective:** to determine the level and structure of community immunity to SARS-CoV-2 among the population of St. Petersburg during the period of intensive spread of COVID-19. **Materials and methods.** Selection of volunteers for the study was carried out through interviewing and randomization. The exclusion criterion was active COVID-19 infection at the time of the survey. 2713 people aged 1 to 70 years and above were

examined for the presence of specific antibodies to SARS-CoV-2. Antibodies were detected by enzyme immunoassay. **Results and discussion.** Studies have shown that in St. Petersburg, in the active phase of COVID-19 epidemic, there was a moderate seroprevalence to SARS-CoV-2, which amounted to 26 %, against the background of a high frequency (84.5 %) of asymptomatic infection in seropositive individuals who did not have a history of COVID-19 disease, positive PCR result and ARI symptoms on the day of examination. The maximum indicators of herd immunity were established in children 1–6 years old (31.1 %), 7–13 years old (37.7 %) and people over 70 years old (30.4 %). Differences in the level of seroprevalence in the age groups of 18–49 years are statistically significant. The highest level of seroprevalence was found among the unemployed (29.7 %), healthcare workers (27.1 %), education sector (26.4 %) and business sector personnel (25 %). In convalescents, COVID-19 antibodies are produced in 75 % of cases. In individuals with positive result of PCR analysis carried out earlier, antibodies are detected in 70 % of the cases. The results of the study of herd immunity to SARS-CoV-2 are essential to forecast the development of the epidemiological situation, as well as to plan measures for specific and non-specific prevention of COVID-19.

Key words: Coronavirus SARS-CoV-2, COVID-19, seroprevalence, incidence, asymptomatic infection.

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

Corresponding author: Vyacheslav S. Smirnov, e-mail: vssmi@mail.ru.

Citation: Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Bashketova N.S., Fridman R.K., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Chkhindzheriya I.G., Grechaninova T.A., Agapov K.A., Arsent'eva N.A., Bazhenova N.A., Batsunov O.K., Danilova E.M., Zueva E.V., Komkova D.V., Kuznetsova R.N., Lyubimova N.E., Markova A.N., Khamitova I.V., Lomonosova V.I., Vetrov V.V., Milichkina A.M., Dedkov V.G., Totolyan A.A. Herd Immunity to SARS-CoV-2 among the Population in Saint-Petersburg during the COVID-19 Epidemic. *Problemny Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2020; 3:124–130. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-124-130

Received 21.09.20. Accepted 23.09.20.

Popova A.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-5307>

Lyalina L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9921-3505>

Smirnov V.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2723-1496>

Kuznetsova R.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4932-6733>

Dedkov V.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5500-0169>

Totolyan A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

В конце 2019 – начале 2020 г. появились сообщения о вспышке инфекции, вызванной новым штаммом бета-коронавируса SARS-CoV-2, а заболевание Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определила как coronavirus disease 2019 (COVID-19) [1–3]. По данным ВОЗ, в июне 2020 г. эта инфекция выявлялась практически повсеместно, в мире зарегистрировано более 9,5 млн заразившихся, из которых 4,8 млн выздоровели, 486 тыс. летальных исходов. В Российской Федерации по состоянию на середину июня заболели COVID-19 493657 человек, показатель заболеваемости составил 336,18 на 100 тыс. населения.

В Санкт-Петербурге первый случай COVID-19 диагностирован 2 марта 2020 г., период нарастания заболеваемости продолжался в течение 10 недель, максимальные показатели зафиксированы в середине мая, в дальнейшем отмечалось статистически значимое снижение заболеваемости. Указанная динамика развития эпидемического процесса инфекции, обусловленной SARS-CoV-2, и опубликованные данные о сроках формирования антител класса IgG к вирусу в течение 2–4 недель [4] послужили основанием для

выбора оптимального срока проведения исследования по определению серопревалентности к COVID-19 среди населения Санкт-Петербурга (рисунок).

Вопросы популяционного иммунитета к COVID-19 вызывают большой интерес и имеют важное научное и практическое значение. Результаты исследования о состоянии коллективного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 необходимы для разработки прогноза развития эпидемиологической ситуации, а также для планирования мероприятий по специфической и неспецифической профилактике COVID-19. Наличие широкой иммунной прослойки среди населения может служить эффективным фактором снижения темпов распространения возбудителя. Согласно опубликованным данным, пороговый уровень популяционного иммунитета, необходимый для угасания ряда инфекций, составляет 60–70 % [5]. Однако в недавнем исследовании по COVID-19 показано, что эта величина может быть снижена до 40 % [6]. Это зависит от особенностей жизни людей в современных условиях, интенсивности миграции, активности контактов, своевременности и эффективности противоэпидемических мероприятий. В связи с изложенным



Понедельная суммарная заболеваемость (число зараженных) COVID-19 в Санкт-Петербурге в 2020 г.

Примечание: стрелкой отмечен период, в который проведены исследования на серопревалентность (15.06.2020 – 20.06.2020).

Weekly total COVID-19 incidence (number of infected) in St. Petersburg in 2020

Note: the arrow indicates the beginning and the end of the study (June 15 – June 20, 2020).

изучение популяционного иммунитета на конкретных территориях представляет значительный интерес и может служить важным обоснованием при планировании профилактических мероприятий.

Целью проведенного сероэпидемиологического исследования явилось определение уровня и структуры популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период интенсивного распространения COVID-19.

Материалы и методы

Работа проводилась в рамках широкомасштабного проекта Роспотребнадзора по оценке популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 у населения Российской Федерации с учетом протокола, рекомендованного ВОЗ. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Перед началом исследования все участники или их юридические представители ознакомились с целью и методикой исследования и подписали информированное согласие.

Отбор добровольцев для исследования проводили методом анкетирования и случайной выборки. Критерием исключения являлась активная инфекция COVID-19 в момент анкетирования. Объем выборки определяли по формуле:

$$n = \frac{t^2 \cdot p(1-p)}{m^2},$$

где n – объем выборки;

t – уровень точности (для 95 % ДИ $t=1,96$);

p – оценочная распространенность изучаемого явления (в данном случае при 50 % = 0,5);

m – допустимая ошибка – 5 % [7].

Расчет объема возрастной группы:

$n = 1,962 \cdot 0,5(1 - 0,5) / 0,052 = 384$ человека.

По результатам анкетирования отобрано 3806 волонтеров, из них у 2713 человек отбирали пробы крови из вены для последующего исследования на наличие специфических антител к SARS-CoV-2.

Возраст обследованных добровольцев варьировал от 1 года до 70 лет и старше. Количество волонтеров во всех возрастных группах являлось сопоставимым (от 377 до 442), за исключением группы 70 лет и старше, однако ее численность является репрезентативной. Учитывая особенности детского возраста, первую группу разделили на три подгруппы: 1–6 лет, 7–13 лет и 14–17 лет. Из всего количества волонтеров доля лиц с наличием в анамнезе верифицированного диагноза COVID-19 составила 3,1 % (84 человека), лиц с признаками ОРВИ неуточненной этиологии в день обследования – 2,6 % (70 человек).

Пробы крови волонтеров отбирали в вакутейнеры с ЭДТА и обрабатывали методом центрифугирования. Плазму отделяли от клеточных элементов, переносили в пластиковые пробирки и хранили до исследования при температуре 4 °С. Содержание антител к SARS-CoV-2 определяли методом ИФА с использованием набора реагентов для анализа сыворотки

или плазмы крови человека на наличие специфических иммуноглобулинов класса G к нуклеокапсиду вируса SARS-CoV-2 производства Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболensk). Результаты учитывали качественным методом и считали положительными при превышении уровня cut-off.

Статистическую обработку проводили с использованием методов вариационной статистики с помощью статистического пакета Excel и программного продукта WinPepi (версия 11.65). Для оценки достоверности различий сравниваемых показателей использовали уровень вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Уровень серопревалентности среди населения Санкт-Петербурга. Число жителей города, содержащих IgG антитела к SARS-CoV-2, в целом составило 26,0 % (705/2713), гендерные различия в серопозитивности не установлены. Среди мужчин IgG антитела выявлены у 24,4 % волонтеров, у женщин – 26,9 % ($p > 0,05$).

При оценке серопревалентности в различных возрастных группах волонтеров (табл. 1) установлено, что среди детей в возрасте до 17 лет показатели являлись более высокими по сравнению с возрастными группами 18–49 лет, различия статистически значимы ($p < 0,05$). Различия в уровнях серопревалентности среди детей и возрастных категорий 50 лет и старше не существенны ($p > 0,05$).

Важным показателем является уровень серопревалентности к SARS-CoV-2 среди населения разных районов города (табл. 2). Как следует из представленных данных, наименьший уровень серопозитивности выявлен среди обследованных жителей Фрунзенского района, однако этот показатель существенно не отличался еще в пяти районах (Адмиралтейский, Колпинский, Красносельский, Московский, Центральный). В десяти районах города показатели серопревалентности оказались достоверно выше и варьировали от 24,2 % в Приморском районе до 39,5 % в Петродворцовом районе.

При анализе результатов исследования проведена оценка уровня серопревалентности в разных профессиональных и социальных группах населения (табл. 3).

Исследование показало, что наибольший уровень серопозитивности выявлен у безработных (29,5 %), детей (29,3 %), работников здравоохранения (27,1 %), образования (26,4 %), бизнесменов (25,0 %), различия показателей серопревалентности в социально-профессиональных группах оказались статистически незначимы ($p > 0,05$). Наименьший уровень серопревалентности отмечался среди военнослужащих, однако к этим результатам вследствие небольшой выборки стоит относиться с известной долей осторожности. С другой стороны, эти данные требуют повышенного внимания при их независимом подтверждении, поскольку могут свидетельствовать о низкой вовлечен-

Таблица 1 / Table 1

Серопозитивность к SARS-CoV-2 жителей Санкт-Петербурга в разных возрастных группах
Seropositivity to SARS-CoV-2 among the residents of St. Petersburg in different age groups

Возрастная группа Age group, years		Общее кол-во обследованных Total number of the examined people	Серопозитивные Seropositive	Серонегативные Seronegative	Серопревалентность, % (95 % доверительный интервал) Seroprevalence, % (95 % confidence interval)
1–17		377	121	256	32,1 (27,4–37,1)
В том числе: Including:	1–6	106	33	73	31,1 (22,5–40,7)
	7–13	146	55	91	37,7 (29,8–46,1)
	14–17	125	33	92	26,4 (18,9–35,0)
18–29		390	83	307	21,3 (17,3–25,7)
30–39		416	95	321	22,8 (18,9–27,2)
40–49		395	88	307	22,3 (18,3–26,7)
50–59		413	105	308	25,4 (21,3–29,9)
60–69		442	128	314	29,0 (24,8–33,4)
70 и старше 70 and more		280	85	195	30,4 (25,0–36,1)
Итого: Total:		2713	705	2008	26,0 (24,3–27,7)

ности военнослужащих в процессы формирования популяционного иммунитета к COVID-19, что может быть обусловлено известной закрытостью воинских коллективов и связанной с этим изолированностью от эпидемического процесса в городе.

Уровень серопозитивности у лиц, переболевших или имевших контакт с больными COVID-19.

Особенностью COVID-19 является значительная гетерогенность антительного ответа как в процессе заболевания, так и в период реконвалесценции [2], причем далеко не всегда удается связать серопозитивность реконвалесцента с тяжестью перенесенного заболевания и продолжительностью постинфекционного анамнеза. В связи с этим анализ анамнестической серопозитивности к COVID-19 у переболевших и имевших или не имевших контакт с больными COVID-19 представляет существенное эпидемиологическое значение. Так, в группе лиц, никогда не имевших явного контакта с больными COVID-19, доля серопозитивных лиц составила 22,6 %, а при наличии подобных контактов этот показатель оказывался почти в два раза выше – 42,1 % ($p<0,05$), причем контакт с больным, как правило, не сопровождался развитием каких-либо клинических проявлений заболевания. Такое явление, при котором возникает серологический ответ в отсутствие манифестации, применительно к гриппу и острым респираторным вирусным инфекциям (ОРВИ) названо инаппарантной сероконверсией, предотвращающей манифестное заболевание [5]. Что касается лиц, перенесших COVID-19, доля серопозитивных в этой группе возросла до 75,0 %, а в подгруппе не имевших в анамнезе COVID-19 24,4 % лиц не имели регистрируемой сероконверсии.

Аналогичная закономерность наблюдалась при определении специфических IgG антител у лиц с различными результатами тестирования на вирус SARS-CoV-2 в полимеразной цепной реакции (ПЦР). В группе с положительными результатами ПЦР доля серопозитивных лиц составила в среднем 69,9 % (63 человека), при отрицательной ПЦР – только 28,6 % ($p<0,05$).

В обследованной когорте 97,4 % лиц не имели признаков ОРВИ и доля сероположительных в ней не отличалась от средней по всей популяции – 25,2 %. Иная ситуация наблюдалась у добровольцев (70 человек), имевших на момент обследования проявления ОРВИ неуточненной этиологии. В этой группе доля сероположительных проб увеличилась до 55,0 % ($p<0,05$).

Исследование популяционного иммунитета оказалось бы неполным без анализа сероконверсии среди лиц с бессимптомным течением инфекции. Считается, что до 80 % всех случаев инфицирования COVID-19 может протекать бессимптомно [8]. Некоторые авторы считают это состояние бессимптомным носительством, при котором в мазках из зева или плазме крови методом ПЦР выявляется РНК вируса. Такое состояние чаще всего квалифицируется как бессимптомное течение инфекции и/или бессимптомное носительство [9]. На подобное носительство может формироваться иммунный, в том числе адаптивный, ответ. Эти носители чаще всего попадают в поле зрения исследователей только в случае проведения каких-либо массовых обследований, либо с целью определения уровней инфицированности, либо, как в данном случае, с целью анализа популяционного иммунитета (табл. 4).

Таблица 2 / Table 2

Серопревалентность к SARS-CoV-2 жителей разных районов Санкт-Петербурга
Seroprevalence to SARS-CoV-2 in residents of different districts of St. Petersburg

Район города District of the city	Серопозитивные Seropositive	Серонегативные Seronegative	Серопревалентность, % (95 % доверительный интервал) Seroprevalence, % (95 % confidence interval)	Заболеваемость, $\frac{0}{0000}$ Morbidity, $\frac{0}{0000}$
Адмиралтейский Admiralteysky	18	62	22,5 (13,9–33,2)	327,3
Василеостровский Vasileostrovsky	35	96	26,7 (19,4–35,2)	313,4
Выборгский Vyborgsky	87	199	30,4 (25,1–36,1)	299,8
Калининский Kalininsky	80	228	26,0 (21,2–31,3)	385,1
Кировский Kirovsky	34	93	26,8 (19,3–35,4)	393,8
Колпинский Kolpinsky	8	28	22,2 (10,1–39,2)	421,7
Красногвардейский Krasnogvardeisky	58	140	29,3 (23,1–36,2)	379,0
Красносельский Krasnoselsky	30	101	22,9 (10,5–20,9)	353,1
Кронштадтский* Kronshtadsky*	1	1	-	1204,4
Курортный Kurortny	6	9	40,0 (16,3–67,7)	261,5
Московский Moskovsky	44	143	23,5 (17,7–30,3)	469,4
Невский Nevsky	64	161	28,4 (22,7–34,8)	463,6
Петроградский Petrogradsky	46	122	27,4 (20,78–34,8)	276,6
Петродворцовый Petrodvortsovy	11	17	39,3 (21,5–59,4)	425,1
Приморский Primorsky	103	326	24,2 (20,0–28,3)	308,7
Пушкинский Pushkinsky	28	61	31,5 (22,02–42,17)	437,5
Фрунзенский Frunzensky	25	127	16,4 (10,9–23,3)	297,3
Центральный Central	27	94	22,3 (15,3–30,8)	297,3
Итого: Total:	705	2008	26,0 (24,3–27,7)	328,3

Примечание: *Доля серопозитивных для Кронштадтского района не определялась в связи с малым объемом выборки.

Note: *The proportion of seropositive persons for Kronstadsky district was not determined due to the extremely small sample size.

Всего в рамках популяционного исследования выявлено 705 серопозитивных добровольцев, из них у 84,5 % не установлено каких-либо симптомов, характерных для COVID-19. Учитывая, что они не имели ни клинических, ни серологических признаков текущего инфекционного процесса и не отнесены к реконвалесцентам после COVID-19, с высокой долей вероятности можно утверждать, что эти лица могли перенести заболевание в инapparантной форме и обладают адаптивным ответом на этот анамнестический процесс. Таким образом, данное состояние с достаточным на то основанием можно отнести к феномену инapparантной сероконверсии как проявлению общепопуляционного иммунитета, столь необходимого для успешного преодоления коронавирусной инфекции.

Результаты проведенного исследования показыва-

ли, что в Санкт-Петербурге общий уровень сероконверсии к SARS-CoV-2 составил 26,0 % и сравнительно равномерно распределялся в большинстве районов города. Некоторая тенденция к повышению серопревалентности отмечена среди детей в возрасте 1–6, 7–13 лет и жителей в возрасте 50 лет и старше, различия в серопозитивности в этих возрастных группах статистически недостоверны. В то же время различия показателей серопревалентности среди взрослых 18–49 лет и среди детей, а также лиц старших возрастных групп оказались статистически значимы.

При сопоставлении уровней заболеваемости COVID-19 и серопозитивности к SARS-CoV-2 очевидной связи между двумя показателями не установлено (табл. 2). Наибольшее число подтвержденных случаев COVID-19 диагностировано в Невском, Петроградском, Фрунзенском и Приморском районах,

Таблица 3 / Table 3

Серопозитивность к SARS-CoV-2 в различных профессиональных и социальных группах населения
Seropositivity to SARS-CoV-2 in various professional and social groups of the population

Обследованная группа Surveyed group	Серопозитивные Seropositive	Серонегативные Seronegative	Серопревалентность, % (95 % доверительный интервал) Seroprevalence, % (95 % confidence interval)
Медицинские работники Medical workers	109	294	27,1 (22,8–31,7)
Работники науки Academic workers	11	56	16,4 (8,5–27,5)
Бизнесмены Businessmen	44	132	25,0 (18,8–32,1)
Работники образования Education workers	62	173	26,4 (20,9–32,5)
Творческие деятели Creative figures	21	68	23,6 (15,2–33,8)
Промышленные работники Industrial workers	43	157	21,5 (16,0–27,9)
Работники транспорта Transport workers	15	57	20,8 (12,2–32,0)
Военнослужащие Military personnel	2	19	9,5 (1,2–30,4)
Госслужащие Civil servants	18	63	22,2 (13,7–32,8)
Офисные работники Office workers	97	325	23,0 (19,1–27,3)
Дети Children	86	208	29,3 (24,1–34,8)
Безработные Unemployed	109	261	29,5 (24,9–34,4)
Прочие Other	87	193	31,1 (25,7–36,9)

тогда как максимальная серопозитивность отмечалась в Петродворцовом, Пушкинском и Выборгском районах. Наиболее высокий уровень заболеваемости в Курортном районе может быть связан с расположением двух крупных лечебно-профилактических организаций для больных и контактных по COVID-19.

Таким образом, в Санкт-Петербурге в активную фазу развития эпидемического процесса COVID-19

наблюдается умеренная серопревалентность к SARS-CoV-2, несмотря на подавляющее число случаев (84,5 %) инapparантной формы течения инфекционного процесса. Отсутствие явных симптомов заболевания не позволяет с достаточной степенью достоверности оценить реальное распространение инфекции и сроки формирования прочного популяционного иммунитета.

Таблица 4 / Table 4

Доля лиц с бессимптомным течением COVID-19 из общего числа серопозитивных жителей разных возрастных групп Санкт-Петербурга
The share of people with asymptomatic COVID-19 infection out of the total number of seropositive residents of different age groups in St. Petersburg

Возрастная группа Age group	Выявлено серопозитивных лиц Identified seropositive persons	В том числе с бессимптомным течением Including asymptomatic	Доля лиц с бессимптомным течением, % (95 % доверительный интервал) Proportion of asymptomatic individuals, % (95 % confidence interval)
1–17	121	104	85,9 (78,5–91,6)
18–29	83	68	81,9 (72,0–89,5)
30–39	95	87	91,6 (84,1–96,3)
40–49	88	78	88,6 (80,1–94,4)
50–59	105	84	80,0 (70,1–87,2)
60–69	128	105	82,0 (74,3–88,3)
70 и старше 70 and more	85	70	82,4 (72,6–89,8)
Итого: Total:	705	596	84,5 (81,7–87,1)

Таким образом, уровень популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период интенсивного распространения инфекции COVID-19 составил 26 %. Максимальные показатели коллективного иммунитета установлены у детей 1–6 лет (31,1 %), 7–13 лет (37,7 %) и лиц старше 60 лет (29,0–30,4 %). В социально-профессиональной структуре населения наибольший уровень серопревалентности выявлен среди безработных (29,7 %), работников здравоохранения (27,1 %), образования (26,4 %) и бизнеса (25 %). У лиц, перенесших инфекцию COVID-19, антитела в плазме крови обнаружены в 75 % случаев. У лиц с позитивным результатом ПЦР-анализа, полученным ранее, антитела выявлены в 70 % случаев. Среди серопозитивных к SARS-CoV-2 жителей Санкт-Петербурга доля бессимптомных форм инфекции составила 84,5 %.

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

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Медицинского центра ФБУНИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера за техническую помощь при организации и проведении исследования: Бобковой И.Ю., Бурцевой Г.Ф., Васильевой Е.В., Гольмгрейн А.Б., Зориной О.Ф., Кондаурову С.В., Кравцовой Л.В., Кузнецовой Ю.В., Макаровой Е.Ю., Монахову О.Л., Никандрову Т.А., Ниловой Л.В., Пирумову Д.Р., Ракитянской Н.В., Расшивкиной Л.Г., Саблиной И.Б., Степановой Л.О., Фрейман А.Б., Яицкой И.Н.

Список литературы

1. Выступление Генерального директора ВОЗ на пресс-брифинге по коронавирусной инфекции 2019-nCoV, 11 февраля 2020 г. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020> (дата обращения 15.09.2020).
2. Hou H., Wang T., Zhang B., Luo Y., Mao L., Wang F., Wu S., Sun Z. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Transl. Immunology*. 2020; 9(5):e01136. DOI: 10.1002/cti2.1136.
3. Xu X., Chen P., Wang J., J. Feng, H. Zhou, Li X., Zhong W., Hao P. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China Life Sci.* 2020; 63(3):457–60. DOI: 10.1007/s11427-020-1637-5.
4. Clemente-Suárez V.J., Hormeño-Holgado A., Jiménez M., Benítez-Agudelo J.C., Navarro-Jiménez E., Perez-Palencia N., Maestre-Serrano R., Laborde-Cárdenas C.C., Tórnoro-Aguilera J.F. Dynamics of population immunity due to the herd effect in the COVID-19 pandemic. *Vaccines*. 2020; 8(2):236. DOI: 10.3390/vaccines8020236.
5. Смирнов В.С., Зарубаев В.В., Петленко С.В. Биология возбудителей и контроль гриппа и ОРВИ. СПб: Гиппократ; 2020. 336 с.
6. Britton T., Ball F., Trapman P. A mathematical model reveals the influence of population heterogeneity on herd immunity to SARS-CoV-2. *Science*. 369(6505):846–9. DOI: 10.1126/science.abc6810.
7. Newcombe R.G. Two-Sided Confidence Intervals for the single proportion: Comparison of seven methods. *Stat. Med.* 1998; 17(8):857–72. DOI: 10.1002/(sici)1097-0258-(19980430)17:8<857::aid-sim777>3.0.co;2-e.
8. Felsenstein S., Herbert J.A., McNamara P.S., Hedrich C.M. COVID-19: Immunology and treatment options. *Clin. Immunol.* 2020; 215:108448. DOI: 10.1016/j.clim.2020.108448.
9. Lai C.-C., Liu Y.H., Wang C.-Y., Wang Y.-H., Hsueh S.-C., Yen M.-Y., W.-C. Ko, Hsueh P.-R. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020; 53(3):404–12. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.02.012.

References

1. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. (Cited 15 Sep 2020) [Internet]. Available from: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>.
2. Hou H., Wang T., Zhang B., Luo Y., Mao L., Wang F., Wu S., Sun Z. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Transl. Immunology*. 2020; 9(5):e01136. DOI: 10.1002/cti2.1136.
3. Xu X., Chen P., Wang J., J. Feng, H. Zhou, Li X., Zhong W., Hao P. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China Life Sci.* 2020; 63(3):457–60. DOI: 10.1007/s11427-020-1637-5.
4. Clemente-Suárez V.J., Hormeño-Holgado A., Jiménez M., Benítez-Agudelo J.C., Navarro-Jiménez E., Perez-Palencia N., Maestre-Serrano R., Laborde-Cárdenas C.C., Tórnoro-Aguilera J.F. Dynamics of population immunity due to the herd effect in the COVID-19 pandemic. *Vaccines*. 2020; 8(2):236. DOI: 10.3390/vaccines8020236.
5. Smirnov V.S., Zarubaev V.V., Petlenko S.V. [Biology of pathogens and control of influenza and ARVI]. Saint Petersburg: Hippocrates; 2020. 336 p.
6. Britton T., Ball F., Trapman P. A mathematical model reveals the influence of population heterogeneity on herd immunity to SARS-CoV-2. *Science*. 369(6505):846–9. DOI: 10.1126/science.abc6810.
7. Newcombe R.G. Two-Sided Confidence Intervals for the single proportion: Comparison of seven methods. *Stat. Med.* 1998; 17(8):857–72. DOI: 10.1002/(sici)1097-0258-(19980430)17:8<857::aid-sim777>3.0.co;2-e.
8. Felsenstein S., Herbert J.A., McNamara P.S., Hedrich C.M. COVID-19: Immunology and treatment options. *Clin. Immunol.* 2020; 215:108448. DOI: 10.1016/j.clim.2020.108448.
9. Lai C.-C., Liu Y.H., Wang C.-Y., Wang Y.-H., Hsueh S.-C., Yen M.-Y., W.-C. Ko, Hsueh P.-R. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020; 53(3):404–12. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.02.012.

Authors:

- Popova A.Yu. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare; 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation. Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation.
- Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation.
- Bashketova N.S., Chkhindzeriya I.G. Rosпотребнадзор Administration in Saint-Petersburg. 19, Stremyannaya St., St. Petersburg, 191025, Russian Federation. E-mail: uprav@78rospotrebznadzor.ru.
- Fridman R.K., Grechaninova T.A., Agapov K.A. Center of Hygiene and Epidemiology in Saint-Petersburg. 77, Volkovsky Avenue, St. Petersburg, 192102, Russian Federation. E-mail: centr@78ce.ru.
- Lyalina L.V., Smirnov V.S., Arsent'eva N.A., Bazhenova N.A., Batsunov O.K., Danilova E.M., Zueva E.V., Komkova D.V., Kuznetsova R.N., Lyubimova N.E., Markova A.N., Khamitova I.V., Lomonosova V.I., Vetrov V.V., Milichkina A.M., Dedkov V.G., Totolyan A.A. Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 14, Mira St., St. Petersburg, 197101, Russian Federation. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Об авторах:

- Попова А.Ю. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7. Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования; Российская Федерация, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.
- Ежлова Е.Б., Мельникова А.А. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7.
- Башикетова Н.С., Чхинджерия И.Г. Управление Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу. Российская Федерация, 191025, Санкт-Петербург, ул. Стремянная, 19. E-mail: uprav@78rospotrebznadzor.ru.
- Фридман Р.К., Гречанинова Т.А., Агапов К.А. Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге, Российская Федерация, 192102, Санкт-Петербург, Волковский пр., 77. E-mail: centr@78ce.ru.
- Лялина Л.В., Смирнов В.С., Арсентьева Н.А., Баженова Н.А., Батунов О.К., Данилова Е.М., Зueva E.B., Комкова Д.В., Кузнецова Р.Н., Любимова Н.Е., Маркова А.Н., Хамитова И.В., Ломоносова В.И., Ветров В.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тотолян А.А. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-131-138

УДК616.98:579.83

С.А. Рудакова¹, Н.А. Пенъевская^{1,2}, А.И. Блох^{1,2}, Д.А. Савельев¹, О.Е. Теслова¹, Н.Е. Канешова¹,
Н.В. Рудаков^{1,2}, Д.В. Транквилевский³

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ИКСОДОВЫМ КЛЕЩЕВЫМ БОРРЕЛИОЗАМ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2019 г. В СРАВНЕНИИ С ПЕРИОДОМ 2002–2018 гг.

¹ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций», Омск, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Омск, Российская Федерация; ³ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии», Москва, Российская Федерация

Цель – анализ эпидемиологической ситуации по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2019 г. в сравнении с периодом 2002–2018 гг. **Материалы и методы.** В статье использованы данные формы № 2 государственной статистической отчетности за 2002–2019 гг. и сведения, полученные Референс-центром по мониторингу за боррелиозами ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» из 74 субъектов России в 2019 г. Основной метод исследования – эпидемиологический с применением современных информационных технологий. **Результаты и обсуждение.** В России в 2019 г. зарегистрировано 8048 случаев заболеваний иксодовыми клещевыми боррелиозами (ИКБ) (5,48 ‰₀₀₀₀). Фактические показатели заболеваемости ИКБ в 2019 г. в целом по стране и по федеральным округам (ФО) в подавляющем большинстве случаев оказались в пределах доверительных границ величин, спрогнозированных методом линейной регрессии на основании изучения динамики эпидемического процесса в 2002–2018 гг. На протяжении 2002–2019 гг. устойчивая тенденция к росту показателей заболеваемости ИКБ наблюдается в Центральном ФО за счет 10 из 18 субъектов (Москва, а также Белгородская, Липецкая, Московская, Брянская, Воронежская, Курская, Рязанская, Тамбовская и Тульская области); в Южном ФО за счет Краснодарского края и Волгоградской области; в Северо-Кавказском ФО – за счет Ставропольского края. Несмотря на то, что в целом по Северо-Западному, Приволжскому и Уральскому ФО за последние 18 лет установилась тенденция снижения уровня заболеваемости ИКБ, в некоторых субъектах этих регионов наблюдается тренд к осложнению эпидемиологической ситуации (республики Коми и Чувашия, а также Пензенская область). При отсутствии выраженной тенденции к изменению показателей заболеваемости ИКБ в целом по Сибирскому и Дальневосточному ФО особое внимание требуют Кемеровская область – Кузбасс, Республика Тыва и Забайкальский край, где выявлен растущий тренд. В Уральском и Сибирском ФО доля безреспираторных форм среди лабораторно подтвержденных случаев ИКБ выше, чем в других регионах, что заслуживает дальнейшего изучения геновидовых особенностей популяций боррелий и их переносчиков. Эффективный контроль эпидемической ситуации по ИКБ в России возможен при условии совершенствования и сохранения, а для субъектов с установленной многолетней тенденцией роста заболеваемости – увеличения объемов профилактических мероприятий, а также усиления зоолого-эпидемиологического мониторинга активности и структуры природных очагов ИКБ.

Ключевые слова: иксодовые клещевые боррелиозы, заболеваемость.

Корреспондирующий автор: Пенъевская Наталья Александровна, e-mail: nap20052005@yandex.ru.

Для цитирования: Рудакова С.А., Пенъевская Н.А., Блох А.И., Савельев Д.А., Теслова О.Е., Канешова Н.Е., Рудаков Н.В., Транквилевский Д.В. Эпидемиологическая ситуация по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2019 г. в сравнении с периодом 2002–2018 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:131–138. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-131-138

Поступила 15.06.20. Отправлена на доработку 08.07.20. Принята к публ. 28.07.20.

S.A. Rudakova¹, N.A. Pen'evskaya^{1,2}, A.I. Blokh^{1,2}, D.A. Savel'ev^{1,2}, O.E. Teslova¹, N.E. Kaneshova¹,
N.V. Rudakov^{1,2}, D.V. Trankvilevsky³

Epidemiological Situation on Tick-Borne Borreliosis in the Russian Federation in 2019 Compared to the Period of 2002–2018

¹Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation;

²Omsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Omsk, Russian Federation;

³Federal Center of Hygiene and Epidemiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Objective: to analyze the epidemiological situation on Ixodidae tick-borne borreliosis in the Russian Federation in 2019 in comparison with the period of 2002–2018. **Materials and methods.** The paper uses the data contained in Form No. 2 of the state statistical reporting for 2002–2019 and information obtained by the Reference Center for Monitoring Borreliosis of the Omsk Research Institute of Natural Focal Infections from 74 constituent entities of Russia in 2019. The main research method is epidemiological one with the use of modern information technologies. **Results and discussion.** In Russia, 8048 cases of tick-borne borreliosis (Lyme disease – LD) were recorded (5.48 ‰₀₀₀₀) in 2019. The actual indicators of the LD incidence for the whole country and federal districts (FD) in 2019 were within the confidence limits predicted with linear regression based on the study of the dynamics of the epidemic process in 2002–2018 in the vast majority of cases. A steady upward trend in the LD incidence was observed during 2002–2019 in the Central Federal District due to 10 out of 18 entities (Moscow, Belgorod, Lipetsk, Moscow, Bryansk, Voronezh, Kursk, Ryazan, Tambov, Tula regions); in the Southern Federal District because of the Krasnodar Territory and the Volgograd Region; in the North Caucasus Federal District – because of the Stavropol Territory. Despite the fact that a downward trend in the incidence of LD has been established over the past 18 years in the North-West, Volga and Ural Federal Districts, in some subjects

of these regions a trend towards an aggravation of the epidemiological situation is observed (the Komi Republic and Chuvashia, Penza Region). In the absence of a pronounced tendency to change in the incidence rate of LD in the Siberian and Far Eastern Federal Districts, Kemerovo Region-Kuzbass, the Republic of Tuva and the Trans-Baikal Territory where a growing trend has been identified require special attention. In the Ural and Siberian Federal Districts, the share of non-erythema forms among laboratory-confirmed cases of LD was higher than in other regions, which merits further study of the genome-specific features of borrelia populations and their carriers. Effective control of the LD epidemiological situation in Russia is possible provided that the control is improved and maintained, and the capacity of preventive measures and zoological-entomological monitoring of the activity and structure of the natural foci of LD is enhanced in the entities with the long-term tendency towards increase in the incidence of the disease.

Key words: *Ixodidae* tick-borne borrelioses, morbidity rates.

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

Corresponding author: Natalia A. Pen'evskaya, e-mail: nap20052005@yandex.ru.

Citation: Rudakova S.A., Pen'evskaya N.A., Blokh A.I., Savel'ev D.A., Teslova O.E., Kaneshova N.E., Rudakov N.V., Trankvilevsky D.V. Epidemiological Situation on Tick-Borne Borreliosis in the Russian Federation in 2019 Compared to the Period of 2002–2018. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:131–138. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-131-138.

Received 15.06.20. Revised 08.07.20. Accepted 28.07.20.

Rudakova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6262-129X>

Pen'evskaya N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7220-4366>

Blokh A.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0756-2271>

Savel'ev D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0920-0100>

Teslova O.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1897-5522>

Kaneshova N.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9572-7792>

Rudakov N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9566-9214>

Trankvilevsky D.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4896-9369>

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ, син.: болезнь Лайма, код по МКБ-10: А.69.2.; L90.4. Акродерматит хронический атрофический; M01.2. Артрит при болезни Лайма) – группа природноочаговых трансмиссивных спирохетозов, вызываемых определенными видами боррелий, передающихся человеку через присасывание иксодовых клещей и характеризующихся склонностью к затяжному хроническому течению [1]. Природные очаги ИКБ широко распространены на территории лесной ландшафтной зоны умеренного климатического пояса всего Северного полушария [2]. Ежегодно в мире регистрируют от 500 до 600 тыс. случаев ИКБ [3–5]. Болезнь Лайма на Европейском континенте – самая распространенная из всех клещевых трансмиссивных инфекций со средневзвешенной заболеваемостью 22 случая на 100 тыс. населения в год [5]. Не случайно с 2018 г. нейроборрелиоз Лайма включен в список болезней, контролируемых ECDC (Европейский центр профилактики и контроля заболеваний) [6].

В Российской Федерации ИКБ занимают ведущее место среди трансмиссивных природноочаговых инфекций по уровню заболеваемости и социально-экономическому ущербу [2, 7].

В ходе проведенной нами оценки динамики инцидентности ИКБ в течение 2002–2018 гг. [8] выявлена достоверная тенденция к снижению уровня заболеваемости для Северо-Западного (СЗФО) и Приволжского (ПФО) федеральных округов, в отличие от Центрального (ЦФО), Южного (ЮФО) и Северо-Кавказского (СКФО) федеральных округов, где отмечена достоверная тенденция к росту. Для Российской Федерации в целом, Уральского (УФО), Сибирского (СФО) и Дальневосточного (ДФО) федеральных округов установлено наиболее вероятное в ближайшей перспективе варьирование показателей заболеваемости в пределах доверительных

интервалов ($ДИ_{95}$) среднесноголетних значений. В половине из 26 субъектов России со среднесноголетним уровнем заболеваемости выше $6,5 \text{ }^0_{0000}$ выявлен достоверный тренд на снижение инцидентности ИКБ. Исключение составили Кемеровская область и Республика Тыва, в которых установлена вероятность дальнейшего роста заболеваемости ИКБ. В группе из 15 субъектов России со среднесноголетним уровнем заболеваемости ИКБ от $2,9 \text{ }^0_{0000}$ до $6,5 \text{ }^0_{0000}$ примерно с равной частотой отмечали тенденцию как к росту, так и к снижению или отсутствию достоверного тренда изменения интенсивности эпидемического процесса. Для группы субъектов России со среднесноголетними показателями заболеваемости ИКБ менее $2,9 \text{ }^0_{0000}$ выявлена высокая вероятность увеличения этого показателя в дальнейшем [8].

Цель – анализ эпидемиологической ситуации по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2019 г. в сравнении с периодом 2002–2018 гг.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили данные формы № 2 государственной статистической отчетности «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» за 2002–2019 гг. и сведения, полученные Референс-центром по мониторингу за боррелиозами ФБУН «Омский НИИ природноочаговых инфекций» из 74 субъектов России в 2019 г. Анализ материала проведен стандартными методами вариационной статистики [9] с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2016 и STATISTICA 6.0 [10]. Для оценки связи между двумя количественными переменными рассчитывали непараметрический коэффициент корреляции τ (греч. – тау) Кендалла [10].

Результаты и обсуждение

За 2019 г. в России зарегистрировано 8048 случаев заболеваний ИКБ, что на 1567 больше по сравнению с 2018 г. Заболевания зафиксированы в 77 субъектах. Как и в предыдущем 2018 г., в 2019 г. 92 % всех случаев ИКБ пришлось на 5 федеральных округов (ФО), среди которых первые три места стабильно занимают ЦФО – 3514 случаев (44 %), СФО – 1169 (14 %) и ПФО – 1030 (13 %). В СЗФО, УФО, ДФО и ЮФО зарегистрировано соответственно 869 (11 %), 799 (10 %), 370 (4 %) и 244 (3 %) случаев ИКБ. Последнее место по числу заболевших занимает СКФО – 53 случая (1 %).

В структуре случаев ИКБ в целом по России доля ЦФО в 2019 г. увеличилась с 38 % в предыдущем году до 44 %. Уменьшились доли СФО (с 17 до 14 %), ПФО (с 15 до 13 %) и УФО (с 12 до 10 %). Доля остальных округов в структуре заболеваемости ИКБ в России не изменилась.

Показатель заболеваемости ИКБ в России за 2019 г. составил 5,48 случая на 100 тыс. населения ($^{0}/_{0000}$). По относительным показателям заболеваемости в 2019 г. первые четыре позиции занимают ЦФО (8,93 $^{0}/_{0000}$), СФО (6,80 $^{0}/_{0000}$), УФО (6,47 $^{0}/_{0000}$) и СЗФО (6,22 $^{0}/_{0000}$).

Увеличение показателя заболеваемости по сравнению с 2018 г. отмечено в ЦФО (с 5,28 до 8,93 $^{0}/_{0000}$), ПФО (с 2,76 до 3,5 $^{0}/_{0000}$), ДФО (с 3,78 до 4,51 $^{0}/_{0000}$) и в меньшей мере СКФО (с 0,34 до 0,54 $^{0}/_{0000}$). При этом снижение показателей инцидентности ИКБ наблюдается в СФО (с 7,72 до 6,80 $^{0}/_{0000}$), УФО (с 7,47 до 6,47 $^{0}/_{0000}$), ЮФО (с 1,70 до 1,48 $^{0}/_{0000}$) и незначительно в СЗФО (с 6,26 до 6,22 $^{0}/_{0000}$). В целом показатель заболеваемости ИКБ в России вырос по сравнению

с 2018 г. (с 4,58 до 5,48 $^{0}/_{0000}$).

Показатели заболеваемости ИКБ в 2019 г. в целом по округам в подавляющем большинстве случаев оказались в пределах доверительных границ величин, спрогнозированных нами [8] на основании изучения динамики эпидемического процесса в 2002–2018 гг. (табл. 1).

Выявленные нами ранее тенденции развития эпидемического процесса ИКБ, рассчитанные по данным 2002–2018 гг. [8], сохранились и в 2019 г. (табл. 2).

На протяжении последних 18 лет устойчивая тенденция снижения показателей заболеваемости ИКБ наблюдается в СЗФО ($T_{сн.}=3,5$ %, $R^2=36,6$, $p=0,008$) и ПФО ($T_{сн.}=4,4$ %, $R^2=58,0$ %, $p<0,001$). СЗФО с первого места по среднемуголетним показателям заболеваемости ИКБ периода 2002–2018 гг. (СМП_{2002–2018}) переместился на четвертое место по показателям 2019 г., а ПФО – с четвертого на шестое место. В 2019 г. по сравнению с 2018 г. более четкой стала тенденция к снижению показателей заболеваемости в УФО ($T_{сн.}=2,4$ %, $R^2=26,7$ %, $p=0,028$).

Устойчивая тенденция к росту инцидентности ИКБ сохранилась в ЦФО ($T_{пр.}=4,1$ %, $R^2=42,1$ %, $p=0,004$), ЮФО ($T_{пр.}=16,0$ %, $R^2=82,6$ %, $p<0,001$) и СКФО ($T_{пр.}=16,8$ %, $R^2=81,3$ %, $p<0,001$). По среднемуголетним показателям заболеваемости ИКБ периода 2002–2018 гг. ЦФО занимал пятое место, а в 2019 г. – первое.

По абсолютному числу случаев ИКБ в ЦФО в 2019 г. лидируют Москва и Московская область (с показателями заболеваемости 13,36 $^{0}/_{0000}$ и 8,65 $^{0}/_{0000}$), где зарегистрировано 67 % всех случаев заболеваний. На 10 (из 18) территориях ЦФО отмечено увеличение показателей заболеваемости ИКБ в 2–4 раза

Таблица 1 / Table 1

Сравнение прогнозных и фактических показателей заболеваемости иксодовыми клещевыми боррелиозами в федеральных округах России в 2019 г.

Comparison of projected and actual incidence rates of Lyme disease in different Federal Districts of Russia in 2019

Территории / Territory	Прогнозные показатели на 2019 г. [5] Projected incidence rate for 2019 [5]		Фактические показатели в 2019 г. Actual incidence rate in 2019	
	среднее значение mean value	95 % ДИ 95 % CI	среднее значение mean value	95 % ДИ 95 % CI
Россия / Russia	4,55	2,88÷6,23	5,48	5,36÷5,60
ЦФО / CFD	6,24	3,76÷8,71	8,93	8,64÷9,23
СЗФО / NWFD	4,51	0,61÷8,41	6,22	5,81÷6,64
ЮФО / SFD	1,39	0,77÷2,02	1,48	1,30÷1,67
СКФО / NCFD	0,44	0,25÷0,63	0,54	0,39÷0,68
ПФО / VFD	2,61	0,23÷4,99	3,50	3,28÷3,71
УФО / UFD	6,63	2,66÷10,60	6,47	6,02÷6,92
СФО / Siberian FD	6,96	4,82÷9,10	6,80	6,41÷7,19
ДФО / FEFD	3,91	1,84÷5,98	4,51	4,05÷4,97

Примечание: прогнозные показатели с 95 % доверительными интервалами определяли на основании данных о заболеваемости за 2002–2018 гг. с использованием функции «Лист прогноза» в Excel 2016; 95 % доверительный интервал фактических показателей заболеваемости вычисляли по Вальду на основе распределения Пуассона.

Note: projected indicators with 95 % confidence intervals were calculated on the basis of morbidity data for 2002–2018 using the Prediction Sheet function in Excel 2016. The 95 % confidence intervals for actual incidence rates were calculated by Wald's method on the basis of Poisson distribution.

Таблица 2 / Table 2

Характеристика линейных трендов динамики заболеваемости ИКБ в федеральных округах России за периоды 2002–2018 гг. и 2002–2019 гг.

Properties of linear trends of Lyme disease incidence in the Federal Districts of Russia in 2002–2018 and 2002–2019

Территории Territory	Показатель заболеваемости, ‰/ (ранг) Incidence rate, ‰/ (rank)		Темп пр./сн. в 2002–2018 гг., % Rate of increase/decrease in 2002–2018, %	Характеристика линии тренда $y=ax+b$ в 2002–2018 гг. Linear trend properties in 2002–2018			Темп пр./сн. в 2002–2019 гг., % Rate of increase/decrease in 2002–2019, %	Характеристика линии тренда $y=ax+b$ в 2002–2019 гг. Linear trend properties in 2002–2019		
	среднеголетний за 2002–2018 гг. long-term annual aver- age for 2002–2018	в 2019 г. in 2019		тенденция tendency	R^2 , %	p		тенденция tendency	R^2 , %	p
СЗФО NWFD	8,68 / (1)	6,22 / (4)	-3,5	↓	33,6	0,015	-3,5	↓	36,6	0,008
УФО UFD	8,63 / (2)	6,47 / (3)	-2,3	↔	22,3	0,056	-2,4	↓	26,7	0,028
СФО Siberian FD	7,32 / (3)	6,80 / (2)	-0,6	↔	5,4	0,370	-0,7	↔	6,8	0,296
ПФО VFD	4,99 / (4)	3,50 / (6)	-4,5	↓	56,2	<0,001	-4,4	↓	58,0	<0,001
ЦФО CFD	4,87 / (5)	8,93 / (1)	3,32	↑	31,4	0,019	4,1	↑	42,1	0,004
ДФО FEFD	4,12 / (6)	4,51 / (5)	-0,45	↔	1,2	0,670	-0,2	↔	0,3	0,819
ЮФО Southern FD	0,50 / (7)	1,48 / (7)	16,9	↑	79,3	<0,001	16,0	↑	82,6	<0,001
СКФО NCFD	0,18 / (8)	0,54 / (8)	18,1	↑	77,9	<0,001	16,8	↑	81,3	<0,001

Примечание: R^2 – коэффициент детерминации линии тренда, p – уровень статистической значимости для коэффициента наклона (a) линии тренда $y=ax+b$.

Note: R^2 – the coefficient of determination for the trend line, p – the level of statistical significance for the slope coefficient (a) of the trend line $y=ax+b$.

по сравнению со среднеголетними показателями 2002–2018 гг. для данного субъекта. Наиболее высокие показатели зарегистрированы в Калужской области (23,15 ‰ – превышение СМП_{2002–2018} в 3,2 раза), в Москве (13,36 ‰ – превышение СМП_{2002–2018} в 2,5 раза) и Рязанской области (10,11 ‰ – превышение СМП_{2002–2018} в 4,2 раза). В четырех субъектах ЦФО (Смоленская, Белгородская, Тверская и Ивановская области) показатели заболеваемости ИКБ (4,64 ‰, 4,46 ‰, 4,46 ‰ и 2,25 ‰ соответственно) остались в пределах доверительных интервалов СМП периода 2002–2018 гг. На четырех административных территориях ЦФО в 2019 г. отмечено снижение показателей заболеваемости ИКБ в 1,7–3,0 раза по сравнению с СМП_{2002–2018}: Ярославская область – 6,49 ‰ (в 3 раза), Костромская область – 9,37 ‰ (в 2,2 раза), Владимирская и Липецкая области – 4,52 ‰ и 2,79 ‰ соответственно (в 1,7 раза).

В ЮФО в 2019 г. 49,6 % случаев ИКБ зарегистрировано в Краснодарском крае, 29,1 % – в Республике Крым, 8,2 % – в Ростовской области и 6,6 % – в Севастополе. Частота случаев ИКБ в пересчете на 100 тыс. населения составила: в Республике Крым – 3,71 ‰, Севастополе – 3,64 ‰, Краснодарском крае – 2,15 ‰, Республике Адыгея – 1,98 ‰.

В СКФО 69,8 % всех зарегистрированных случаев ИКБ приходится на Ставропольский край, в котором на протяжении последних 18 лет отмечена стабильная линейная тенденция роста показателей заболеваемости до 1,32 ‰ в 2019 г. (Тпр.=9,8 %, $R^2=65$ %, $p<0,001$).

$R^2=65$ %, $p<0,001$).

В СЗФО максимальное количество случаев зарегистрировано в Санкт-Петербурге (358), что составляет 41 % от всего числа заболевших в округе. В Ненецком автономном округе случаев ИКБ, как и в предыдущие годы, не зарегистрировано. В большинстве субъектов СЗФО в 2019 г. сохраняется тенденция к снижению заболеваемости ИКБ, за исключением Новгородской области и Республики Коми, где отмечено повышение показателей в 1,3 и 2,3 раза соответственно по сравнению с СМП_{2002–2018} для данных субъектов (11,27 ‰ против 8,52 ‰ и 1,80 ‰ против 0,77 ‰ соответственно).

В ПФО в 2019 г. в большинстве субъектов наблюдается либо сохранение уровня заболеваемости в пределах ДИ₉₅ среднеголетних значений 2002–2018 гг., либо снижение соответствующего показателя на 100 тыс. населения в 1,5–4 раза относительно СМП_{2002–2018}, что поддерживает общую тенденцию снижения показателей заболеваемости в целом по округу. Однако в Пензенской (10,57 ‰) и Нижегородской (5,3 ‰) областях, а также в республиках Мордовия (3,87 ‰) и Чувашия (1,47 ‰) отмечено увеличение показателей заболеваемости ИКБ по сравнению с СМП_{2002–2018} для данных субъектов: в 2,8, 1,5, 1,7 и 2,7 раза соответственно.

В УФО максимальный уровень заболеваемости ИКБ отмечен в Свердловской (12,08 ‰) и Тюменской (6,96 ‰) областях, на которые приходится 65,3 % (522 из 799) и 13,1 % (105 из 799) от

всех случаев, зарегистрированных в округе. По показателям заболеваемости на 100 тыс. населения на третьем месте находится Курганская область (5,0 ‰, 42 случая), а на четвертом – Челябинская область (3,01 ‰, 105 случаев). По основным эндемичным территориям УФО имеет место снижение заболеваемости по сравнению со среднескользящими показателями 2002–2018 гг.: в Свердловской области – в 1,3 раза, в Челябинской области – в 1,8 раза, в Курганской области – в 1,5 раза. В Тюменской области, ЯНАО и ХМАО инцидентность ИКБ в 2019 г. осталась на уровне СМП 2002–2018 гг. данных субъектов.

В СФО 78,2 % случаев ИКБ (914 из 1169) зарегистрировано в Красноярском крае (31,7 %), Кемеровской области-Кузбассе (22 %), Новосибирской (14,1 %) и Томской (10,4 %) областях, показатели заболеваемости в которых составили соответственно 12,9 ‰, 9,57 ‰, 5,91 ‰ и 11,23 ‰. В Томской области на протяжении 2002–2019 гг. сохраняется устойчивая тенденция снижения показателей заболеваемости ИКБ ($T_{сн.}=8,5\%$, $R^2=72\%$, $p<0,001$), показатель заболеваемости в 2019 г. ниже СМП_{2002–2018} в 2,1 раза. Снижение заболеваемости ИКБ наблюдается в Красноярском крае ($T_{сн.}=3,5\%$, $R^2=49\%$, $p=0,003$) и Иркутской области ($T_{сн.}=2,73\%$, $R^2=43,7\%$, $p=0,004$). Самая высокая в СФО инцидентность ИКБ в 2019 г. зарегистрирована в Республике Тыва (16,71 ‰), где, несмотря на более низкие по сравнению с 2018 г. показатели, сохраняется тенденция роста показателей заболеваемости ИКБ на протяжении 2002–2019 гг. ($T_{пр.}=15,7\%$, $R^2=67,5\%$, $p<0,001$). В Кемеровской области показатель заболеваемости увеличился в 1,4 по сравнению со СМП_{2002–2018} при сохраняющейся устойчивой тенденции к росту ($T_{пр.}=6,15\%$, $R^2=63,4\%$, $p<0,001$).

В ДФО в 2019 г. зарегистрировано 79,2 % случаев ИКБ (293 из 370): Приморский край – 39,7 %; Сахалинская область – 16,5 %; Забайкальский край – 15,7 %; Республика Бурятия – 7,3 %, где показатели заболеваемости составили соответственно: 7,70 ‰, 12,45 ‰, 5,42 ‰ и 2,74 ‰. Уровень заболеваемости ниже среднего по России отмечен в Забайкальском (5,42 ‰) и Хабаровском (5,28 ‰) краях, а также в Еврейской автономной (3,73 ‰) и Магаданской (0,70 ‰) областях. Ни одного случая ИКБ не зарегистрировано в Чукотском автономном округе, Амурской области, Камчатском крае и Республике Саха (Якутия). Устойчивый рост показателей заболеваемости ИКБ на протяжении 2002–2019 гг. зафиксирован в Забайкальском крае ($T_{пр.}=12,6\%$, $R^2=68,5\%$, $p<0,001$).

Факторы и группы риска. Существенную роль в заражении населения ИКБ играют сезонные факторы, определяющие активность клещей, что проявляется выраженной летней сезонностью заболеваемости на всех территориях. В ЦФО, СЗФО, ЮФО и ДФО заболеваемость населения ИКБ в 2019 г. регистрировалась с марта по ноябрь; в ПФО и СКФО –

с марта по октябрь. В УФО и СФО эпидемический сезон ИКБ являлся самым непродолжительным – с апреля по октябрь.

Гендерный состав заболевших ИКБ в 2019 г. характеризовался преобладанием лиц женского пола в ЦФО (63,9 %) и ЮФО (60,8 %), в то время как в остальных федеральных округах наблюдалось либо равное соотношение полов (СКФО), либо незначительное преобладание лиц мужского пола (в СЗФО – 50,8 %, УФО – 51,2 %, ПФО – 51,4 %, СФО – 53,2 %, ДФО – 55,7 %).

В целом по России среди заболевших ИКБ в 2019 г. доля сельского населения составила 16,0 % (1290/8048), показатель заболеваемости – 3,45 на 100 тыс. населения, что ниже общего показателя (5,48 ‰). В структуре заболевших ИКБ доля сельского населения в целом по России составляет 16,03 %, варьируя по округам от 8,82 % в ЦФО до 26,8 % в СФО. Величина данного показателя в остальных регионах: ПФО – 26,21 %, ДФО – 22,70 %, СКФО – 20,75 %, ЮФО – 17,21 %, УФО – 15,8 %, СЗФО – 15,42 %. За исключением СФО, интенсивные показатели заболеваемости городского населения выше заболеваемости сельских жителей практически во всех федеральных округах. Максимальное (почти двукратное) превышение показателей заболеваемости ИКБ горожан над аналогичными показателями для сельского населения отмечено в ЦФО, ЮФО и СКФО.

Структура заболеваемости ИКБ населения России по возрастным группам характеризовалась в 2019 г. преобладанием возрастной группы 60–69 лет во всех округах, кроме ЮФО. При этом наименьший удельный вес имели возрастные группы до 1 года и 15–19 лет, что может быть связано с редким контактом этих групп населения с природными очагами. Среди всех округов в структуре заболевших ИКБ в 2019 г. наибольшая доля возрастных групп 2–6, 7–14, 15–19 и 20–29 лет зарегистрирована в СКФО (10; 10; 7,5 и 12,5 % соответственно). Возрастные группы 30–39 и 40–49 лет лидируют в структуре больных ИКБ в ЮФО (20,5 и 16,7 % соответственно). Наибольший удельный вес больных ИКБ в возрасте 50–59 лет отмечен в СЗФО (21,3 %), на втором месте ПФО (20,8 %), на третьем – ЦФО (20,2 %). Больные ИКБ в возрасте 60–69 лет в общей структуре больных в ПФО составили 30,2 %; ДФО – 22,5 %; ЦФО – 22,3 %; СЗФО – 22,2 %; УФО – 21,6 %; СФО – 21,1 %; СКФО – 20 %; ЮФО – 14,9 %. Доля заболевших ИКБ в возрасте 70 лет и старше в общей структуре больных в 2019 г.: в СЗФО – 15,7 %; УФО – 15,3 %; ЦФО – 13,8 %; ПФО – 13,5 %; ДФО – 12,5 %; СФО – 11,7 %; СКФО – 7,5 %; ЮФО – 5,1 %.

Среди детей в большинстве федеральных округов, за исключением СКФО и ЮФО, показатели заболеваемости в возрасте 0–17 лет (включительно) в 1,5–3,3 раза меньше общего показателя, рассчитанного на все население. Максимальные различия имели место в ЦФО (2,73 ‰ против 8,93 ‰). В

СКФО заболеваемость ИКБ детей 0–17 лет составила 0,61 ‰ против 0,54 ‰ среди всего населения, в ЮФО – 1,13 ‰ против 1,48 ‰. Во всех ФО в 2019 г. максимальные показатели заболеваемости ИКБ среди детей отмечены в возрастной группе 3–6 лет, минимальные показатели – в группе детей до 1 года. Ни одного случая заболеваний ИКБ детей до 1 года не зарегистрировано в ЮФО, СКФО, ПФО и УФО.

В шести из восьми ФО показатель заболеваемости ИКБ детей 0–17 лет, проживающих в сельских поселениях, ниже аналогичного общего показателя для данной возрастной группы. В СФО заболеваемость ИКБ детей в сельской местности выше: 4,21 ‰ против 3,75 ‰ (общий показатель заболеваемости детей 0–17 лет); в ДФО эти показатели примерно равны – 2,42 ‰ и 2,40 ‰ соответственно.

В социальной структуре заболевших ИКБ в ЦФО, ПФО, СЗФО, УФО и СКФО наибольшую долю составляют пенсионеры и инвалиды (36,1; 41,0; 38,1, 41,2 и 27,5 % соответственно) (табл. 3). В ЮФО среди больных ИКБ больше всего безработных (32,1 %), в ДФО и СФО – работающих (42,1 и 34,3 % соответственно).

Согласно результатам эпидемиологических исследований, среди обстоятельств заражения во всех округах наиболее частыми (более 50 %) являлись выезды на дачу и базы отдыха, за исключением ЮФО (40,4 %) и СФО (45,9 %) (табл. 3).

Частота контактов населения с территориями,

где обитают переносчики, и зараженность последних – факторы, во многом определяющие уровень заболеваемости населения ИКБ [2]. Ранговое положение федеральных округов по показателям заболеваемости ИКБ в 2019 г. полностью совпадает с их ранговым положением по обращаемости населения по поводу присасывания клещей. Всего в 2019 г. в России зарегистрировано 522089 лиц, обращавшихся за помощью по поводу присасывания клеща. В общей структуре обращаемости территории распределились следующим образом: ЦФО – 25 %; СФО – 24 %; ПФО – 18 %; УФО – 14 %; СЗФО – 12 %; ДФО – 4 %; ЮФО – 2 %; СКФО – 1 %.

Зараженность боррелиями клещей *I. persulcatus*, собранных с растительности в 2019 г., варьировала по округам от 12,1 % (в ПФО) до 31,0 % (в СФО), составляя в среднем 25,2 % (табл. 4). Частота выявления ДНК боррелий в клещах *I. persulcatus*, снятых с людей, составляла в среднем 27,8 %. Иксодовые клещи других видов, собранные в природных очагах, были инфицированы боррелиями в среднем в 4,6 %, а снятые с людей – в 17,9 % случаев.

Корреляционный анализ с использованием рангового коэффициента Кендалла выявил наличие прямой связи между показателями заболеваемости и зараженностью *I. persulcatus*, собранных с растительности ($\tau=0,1854$; $p<0,05$), с зараженностью *I. persulcatus*, снятых с людей ($\tau = 0,2243$; $p<0,05$), а также с зараженностью других видов клещей, снятых с людей ($\tau = 0,2396$; $p<0,05$).

Таблица 3 / Table 3

Распределение случаев заболеваний ИКБ в 2019 г. в федеральных округах России по социальным группам и обстоятельствам заражения, %
Distribution of Lyme disease cases in the Federal Districts of Russia in 2019 by social groups and the terms of infection, %

Регионы Regions	Социальные группы, % Social groups, %							Обстоятельства заражения, % Terms of infection, %					
	неорганизованные дети children not attending kindergarten	дети, посещающие ДДУ children attending kindergarten	школьники school children	студенты students	работающие working people	безработные unemployed	пенсионеры, инвалиды retired people, disabled people	сельская местность rural population	город urban population	выезд на дачу trips to country house	выезд на базу отдыха trips to the recreation centers	выезд за пределы области visits to other regions	не установлены not identified
ЦФО CFD	1,9	1,7	2,6	0,6	27,6	29,6	36,1	9,8	9,3	36,4	18,6	15,3	10,7
СФО Siberian FD	3,5	3,2	5,3	1,7	34,3	19,0	33,0	30,7	14,7	23,4	22,5	5,3	3,4
ПФО VFD	0,9	2,4	3,4	0,9	32,4	19,0	41,0	20,0	15,0	32,4	23,9	3,4	5,3
СЗФО NWFD	4,8	4,7	7,2	0,8	21,8	22,6	38,1	16,5	8,9	48,4	13,7	6,7	5,8
УФО UFD	1,3	4,1	5,9	1,5	29,8	16,2	41,2	11,2	10,2	33,2	32,1	7,4	5,9
ДФО FFD	3,9	3,6	5,0	1,4	42,1	13,2	30,7	13,2	6,1	35,4	43,6	1,8	0
ЮФО Southern FD	3,7	2,8	9,3	0,9	29,8	32,1	21,4	18,7	22,2	9,6	30,9	14,3	4,3
СКФО NCFD	5,0	5,0	10,0	7,5	25,0	20,0	27,5	7,5	35,0	22,5	32,5	2,5	0

Таблица 4 / Table 4

Сводные данные результатов ПЦР-индикации боррелий в иксодовых клещах, собранных с растительности и снятых с людей после присасывания в 2019 г.

Aggregated data of PCR-indication of borrelia in ticks collected from plants and removed from people after suction in 2019

Территории Territory	Иксодовые клещи, собранные с растительности Ticks collected from plants			Иксодовые клещи, снятые с людей Ticks, removed from people		
	всего исследовано (<i>I. persulcatus</i> / др. виды) total (<i>I. persulcatus</i> / other species)	обнаружена ДНК-боррелий borrelia DNA is identified in		всего исследовано (<i>I. persulcatus</i> / др. виды) total (<i>I. persulcatus</i> / other species)	обнаружена ДНК-боррелий borrelia DNA is identified in	
		абс. (<i>I. persulcatus</i> / др. виды) Number (<i>I. persulcatus</i> / other species)	% (<i>I. persulcatus</i> / др. виды) Percent (<i>I. persulcatus</i> / other species)		абс. (<i>I. persulcatus</i> / др. виды) Number (<i>I. persulcatus</i> / other species)	% (<i>I. persulcatus</i> / др. виды) Percent (<i>I. persulcatus</i> / other species)
ЦФО / CFD	887 / 6141	169 / 878	19,1 / 14,3	9604 / 32759	975 / 6936	10,2 / 21,2
СФО / Siberian FD	6902 / 12592	2139 / 410	31,0 / 3,3	27165 / 19766	7213 / 4790	26,6 / 24,2
ПФО / VFD	2281 / 5382	275 / 140	12,1 / 2,6	20995 / 26794	7649 / 3211	36,4 / 12,0
УФО / UFD	389 / 170	109 / 7	28,0 / 4,1	24081 / 533	6717 / 15	27,9 / 2,8
СЗФО / NWFD	1631 / 840	305 / 87	18,7 / 10,4	25678 / 8170	7522 / 1233	29,3 / 15,1
ДФО / FFD	3461 / 3152	923 / 64	26,7 / 2,0	5372 / 2048	1365 / 248	25,4 / 12,1
ЮФО / SFD	0 / 6090	0 / 358	0 / 5,9	125 / 4083	5 / 503	4,0 / 12,3
СКФО / NCFD	0 / 8969	0 / 40	0 / 0,5	0 / 997	0 / 91	0 / 9,1

Наибольший удельный вес лабораторно подтвержденных случаев ИКБ отмечен в ЦФО, СКФО и УФО (90,0; 87,5; и 87,1 % соответственно), наименьший – в ЮФО (55,4 %) и ДФО (56,7 %) (табл. 5).

При сопоставлении удельного веса лабораторно подтвержденных форм с удельным весом эритемных форм в общей структуре случаев ИКБ (табл. 5) обращает на себя внимание тот факт, что в УФО и СФО, в отличие от других регионов, у значительной части больных с лабораторно верифицированным диагнозом ИКБ отсутствовал патогномоничный симптом этого заболевания – мигрирующая эритема. Возможно, это может быть связано с существованием геновидовых различий популяций возбудителей ИКБ, циркулирующих в природных очагах разных ландшафтно-географических зон на территории России.

В ходе изучения геновидового разнообразия боррелий в иксодовых клещах природных очагов юга Западной Сибири установлено наличие как

минимум четырех геновидов патогенных боррелий (*B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis* и *B. miyamotoi*). Отмечена более частая встречаемость *B. garinii* по сравнению с *B. afzelii*. Частота выявления *B. garinii* и *B. afzelii* у клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskiy* не имела значимых отличий. 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* [11]. Необходимо продолжение исследований по изучению геновидового разнообразия боррелий в переносчиках и роли луговых клещей *D. reticulatus* в циркуляции боррелий различных геновидов в природных очагах на территории Российской Федерации для оценки экологических особенностей различных видов возбудителей ИКБ и степени эпидемической опасности природных очагов данной инфекции.

Таким образом, эпидемическая ситуация по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской

Таблица 5 / Table 5

Удельный вес эритемных форм и лабораторно подтвержденных случаев ИКБ в федеральных округах России в 2019 г.

Percentage of erythematous forms and laboratory confirmed cases of Lyme disease in the Federal Districts of Russia in 2019

Федеральный округ / Federal District	Доля эритемных форм в общем числе случаев ИКБ, % Percentage of erythematous forms, %	Доля лабораторно подтвержденных случаев ИКБ, % Percentage of laboratory confirmed cases, %
Центральный ФО / Central FD	83,2±0,71	90,0±0,57
Северо-Западный ФО / North-Western FD	71,8±1,63	70,1±1,66
Северо-Кавказский ФО / North-Caucasian FD	90,0±4,74	87,5±5,23
Южный ФО / Southern FD	88,7±2,12	55,4±3,34
Приволжский ФО / Volga FD	76,6±1,63	68,3±1,79
Уральский ФО / Ural FD	57,4±1,80	87,1±1,22
Сибирский ФО / Siberian FD	48,6±1,42	79,9±1,14
Дальневосточный ФО / Far Eastern FD	67,6±2,80	56,7±2,96

Федерации продолжает оставаться напряженной. С 2002 по 2019 год наблюдается тенденция роста показателей заболеваемости ИКБ в ЦФО в 10 (из 18) субъектах (Москва, Белгородская, Липецкая, Московская, Брянская, Воронежская, Курская, Рязанская, Тамбовская и Тульская области); в ЮФО – в Краснодарском крае и Волгоградской области; в СКФО – в Ставропольском крае. Несмотря на то, что в целом по СЗФО, ПФО и УФО за последние 18 лет установилась тенденция снижения уровня заболеваемости ИКБ, в некоторых субъектах этих регионов наблюдается рост (республики Коми и Чувашия, а также Пензенская область).

При отсутствии тенденции изменения показателей заболеваемости ИКБ в целом по СФО и ДФО особого внимания требуют Кемеровская область-Кузбасс, Республика Тыва и Забайкальский край, где выявлен положительный тренд.

В УФО и СФО доля безэритемных форм среди лабораторно подтвержденных случаев ИКБ выше, чем в других регионах, что заслуживает дальнейшего изучения геновидовых особенностей популяции возбудителей и переносчиков.

Эффективный контроль эпидемической ситуации по ИКБ в России возможен при условии сохранения и совершенствования, а для субъектов со сложной эпидемической ситуацией – увеличения объемов профилактических мероприятий, усиления зоолого-энтомологического мониторинга активности и структуры природных очагов ИКБ.

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

Список литературы

1. Carriveau A., Poole H., Thomas A. Lyme Disease. *Nurs Clin. North. Am.* 2019; 54(2):261–75. DOI:10.1016/j.cnur.2019.02.003.
2. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природно-очаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. М.; 2013. 464 с.
3. Глобальные меры по борьбе с переносчиками инфекции на 2017–2030 годы (Версия 5.4). Справочно-информационный документ для обсуждения на 70-й сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения. ВОЗ; 2017. 61 p. [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030_RU.pdf (дата обращения 14.06.2020).
4. 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.
5. Kuehn B.M. CDC estimates 300,000 US cases of Lyme disease annually. *JAMA*. 2013; 310(11):1110. DOI: 10.1001/jama.2013.278331.
6. ECDC comment: European Commission updates communicable disease surveillance list – Lyme neuroborreliosis now under EU/EEA surveillance. 2018. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/ecdc-comment-european-commission-updates-communicable-disease-surveillance-list-lyme> (дата обращения 24.03.2020).
7. Платонов А.Е., Авксентьев Н.А., Авксентьева М.В., Деркач Е.В., Платонова О.В., Титков А.В., Колясников Н.М. Социально-экономическое бремя пяти природно-очаговых инфекций в Российской Федерации. *Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2015; 8(1):47–56. DOI: 10.17749/2070-4909.2015.8.1.047-056.
8. Рудакова С.А., Пенъевская Н.А., Рудаков Н.В., Пакскина Н.Д., Савельев Д.А., Блох А.И. Интенсивность и тенденции развития эпидемического процесса иксодовых клещевых боррелиозов в Российской Федерации в 2002–2018 гг. и прогноз на 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 2:22–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-22-29.
9. Савилов Е.Д., Астафьев В.А., Жданова С.Н., Заруднев Е.А. Эпидемиологический анализ. Методы статистической обработки материала. Новосибирск: Наука-центр; 2011. 156 с.
10. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера; 2002. 312 с.
11. 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; 4:92–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-92-96.

References

1. Carriveau A., Poole H., Thomas A. Lyme Disease. *Nurs Clin. North. Am.* 2019; 54(2):261–75. DOI:10.1016/j.cnur.2019.02.003.
2. Korenberg E.I., Pomelova V.G., Osin N.S. Natural Focal Infections Transmitted by Ixodidae Ticks. M.; 2013. 464 p.
3. [Global vector control measures for 2017-2030 (version 5.4). Background paper for discussion at the 70th world health Assembly]. WHO; 2017. 61 p. (Cited 14 June 2020). [Internet]. Available from: https://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030_RU.pdf.
4. 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.
5. Kuehn B.M. CDC estimates 300,000 US cases of Lyme disease annually. *JAMA*. 2013; 310(11):1110. DOI: 10.1001/jama.2013.278331.
6. ECDC comment: European Commission updates communicable disease surveillance list – Lyme neuroborreliosis now under EU/EEA surveillance. 2 Aug 2018 (cited 24 Feb 2020). [Internet]. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/ecdc-comment-european-commission-updates-communicable-disease-surveillance-list-lyme#_ftn1.
7. Platonov A.E., Avksent'ev N.A., Avksent'eva M.V., Derkach E.V., Platonova O.V., Titkov A.V., Kolyasnikova N.M. [Social-economic burden of five natural focal infections in the Russian Federation]. *Farmakoekonomika. Sovremennaya Farmakoekonomika i Farmakoepidemiologiya [Pharmacoeconomics. Modern pharmacoeconomics and pharmacoepidemiology]*. 2015; (1):47–56. DOI: 10.17749/2070-4909.2015.8.1.047-056. (In Russ.)
8. Rudakova S.A., Pen'evskaya N.A., Rudakov N.V., Paksina N.D., Savel'ev D.A., Blokh A.I. [Intensity and trends in development of epidemic process of ixodes tick-borne borreliosis in the Russian Federation in 2002–2018 and forecast for 2019]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (2):22–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-22-29.
9. Savilov E. D., Astaf'ev V. A., Zhdanova S. N., Zarudnev E. A. [Epidemiological Analysis. Methods of Statistical Data Processing]. Novosibirsk: "Nauka-Tsentr"; 2011. 156 p.
10. Rebrova O.Yu. [Statistical analysis of medical data. Using the STATISTICA application package]. Moscow: "Mediasphere"; 2000. 312 p.
11. Rudakova S.A., Teslova O.E., Kaneshova N.E., Shtrek S.V., Yakimenko V.V., Pen'yevskaya N.A. Genospecific Diversity of Borrelia in Ixodes Ticks of the West Siberia. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (4):92–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-92-96.

Authors:

Rudakova S.A., Teslova O.E., Kaneshova N.E., Savel'ev D.A. Omsk Research Institute of Natural-Focal Infections. 7, Mira Avenue, Omsk, 644080, Russian Federation. E-mail: mail@oniipi.org.
 Pen'yevskaya N.A., Blokh A.I., Rudakov N.V. Omsk Research Institute of Natural-Focal Infections; 7, Mira Avenue, Omsk, 644080, Russian Federation; e-mail: mail@oniipi.org. Omsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. Omsk, Russian Federation.
 Trankvilevsky D.V. Federal Center of Hygiene and Epidemiology. 19a, Varshavskoe Highway, Moscow, 117105, Russian Federation. E-mail: gsen@fcgie.ru.

Об авторах:

Рудакова С.А., Теслова О.Е., Канешова Н.Е., Савельев Д.А. Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций; Российская Федерация, 644080, Омск, проспект Мира, 7. E-mail: mail@oniipi.org.
 Пенъевская Н.А., Рудаков Н.В., Блох А.И. Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций; Российская Федерация, 644080, Омск, проспект Мира, 7; e-mail: mail@oniipi.org. Омский государственный медицинский университет; Российская Федерация, Омск.
 Транквилевский Д.В. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии. Российская Федерация, 117105, Москва, Варшавское шоссе д. 19а. E-mail: gsen@fcgie.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-139-145

УДК 616.98:579.842.23

Е.В. Сазанова, Т.А. Малиюкова, Ю.А. Попов, М.Н. Ляпин

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ И КРИТЕРИЕВ ДЛЯ ОТНЕСЕНИЯ УЧЕБНЫХ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* К III ГРУППЕ ПАТОГЕННОСТИ (ОПАСНОСТИ)

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

Цель исследования – выбор критериев и методических подходов для перевода авирулентных штаммов возбудителя чумы из I группы патогенности (опасности) в III группу. **Материалы и методы.** Проанализированы отечественные и зарубежные нормативные, методические документы, научные публикации в области лабораторной диагностики чумы и обеспечения биобезопасности работ с патогенными биологическими агентами. **Результаты и обсуждение.** Обоснован комплекс критериев для перевода штаммов *Y. pestis* из I группы в III группу патогенности, а также определены методы их оценки. Установлено наличие оснований для перевода в III группу патогенности ряда авирулентных штаммов *Y. pestis*, которые включены в учебный набор, сформированный для освоения модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы». Продемонстрирована целесообразность комбинирования регламентированных методов оценки патогенных свойств чумного микроба с дополнительными, в частности, изучением цитотоксичности штаммов *Y. pestis* в отношении лейкоцитов цельной крови человека *in vitro*. Оценка вирулентности штамма *Y. pestis* должна опираться на комплексную характеристику основных факторов патогенности с помощью современных молекулярно-генетических методов исследования, данных о фенотипических проявлениях их функционирования, а также степени патогенности для чувствительных лабораторных животных. Актуальной задачей является пересмотр используемых количественных показателей для дифференциации штаммов чумного микроба по вирулентности с учетом показателя LD₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Ключевые слова: возбудитель чумы, группы патогенности (опасности), биологическая безопасность, учебные штаммы.

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

Для цитирования: Сазанова Е.В., Малиюкова Т.А., Попов Ю.А., Ляпин М.Н. Разработка методических подходов и критериев для отнесения учебных штаммов *Yersinia pestis* к III группе патогенности (опасности). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:139–145. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-139-145

Поступила 21.11.19. Отправлена на доработку 09.01.20. Принята к публ. 16.01.20.

E.V. Sazanova, T.A. Malyukova, Yu.A. Popova, M.N. Lyapin

Development of Methodological Approaches and Criteria to Classify *Yersinia pestis* Training Strains as an Agent of Pathogenicity (Hazard) Group III

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

Abstract. Objective of the study was to select the criteria and methodological approaches to reclassify avirulent strains of plague agent from pathogenicity (hazard) group I into pathogenicity group III. **Materials and methods.** We have reviewed domestic and foreign normative, methodological documents, scientific publications in the field of laboratory diagnostics of plague and biosafety provision while working with pathogenic biological agents. **Results and discussion.** A complex of criteria for reclassification of *Y. pestis* strains from hazard group I into hazard group III has been substantiated; the methods for their assessment identified. Validation has revealed the grounds for reassignment of a number of avirulent *Y. pestis* strains included into the training kit which is compiled for mastering the training module “Microbiology and laboratory diagnostics of plague” into pathogenicity group III. We have demonstrated the feasibility of combining the structured methods of assessment of pathogenic properties in plague microbe with additional informative ones; in particular, evaluation of cytotoxicity of *Y. pestis* strains in relation to leucocytes of whole human blood *in vitro*. Analysis of a strain virulence should be built on complex characterization of major pathogenicity factors using advanced molecular-genetic research methods, the data on phenotypic manifestations of their functioning, as well as the level of pathogenicity for sensitive laboratory animals. The review of the utilized quantitative indicators for differentiation of plague microbe strains by virulence taking into account LD₅₀ values for *Y. pestis* EV NIEG strain is a relevant task. It is practical to supplement the complex approach with informative research methods, notably, characterization of strain cytotoxicity which shows high correlation with virulence criterion LD₅₀.

Key words: plague agent, pathogenicity (hazard) groups, biological safety, strains used for training.

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

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

Citation: Sazanova E.V., Malyukova T.A., Popova Yu.A., Lyapin M.N. Development of Methodological Approaches and Criteria to Classify *Yersinia pestis* Training Strains as an Agent of Pathogenicity (Hazard) Group III. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2020; 3:139–145. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-139-145

Received 21.11.19. Revised 09.01.20. Accepted 16.01.20.

Sazanova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9140-3910>

Malyukova T.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5629-4111>

Popova Yu.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7641-6334>

Одним из основных методов получения информации при эпидемиологическом мониторинге 11 природных очагов чумы на территории Российской Федерации, согласно действующим нормативно-методическим документам по санитарной охране территории МУ 3.1.3.2355-08 и профилактике чумы СП 3.1.7.3465-17, является лабораторное исследование носителей и переносчиков чумного микроба, больных людей, животных и объектов окружающей среды. В соответствии с национальной «Классификацией биологических агентов, вызывающих болезни человека, по группам патогенности», представленной в санитарно-эпидемиологических правилах по безопасности работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности) СП 1.3.3118-13, возбудитель чумы отнесен в I группу патогенности (опасности). Персонал лабораторий, выполняющий индикацию и идентификацию чумного микроба, должен иметь допуск к работе с микроорганизмами данной группы. Одним из основных условий допуска является прохождение профессиональной переподготовки с освоением методов безопасной работы. При обучении микробиологическим методам лабораторной диагностики чумы используют штаммы *Y. pestis* с различной вирулентностью, в том числе высоковирулентный *Y. pestis* 231(708), что повышает вероятность инфицирования обучающихся. Вместе с тем в Указе Президента Российской Федерации от 11 марта 2019 г. № 97 одним из приоритетных направлений государственной политики в области обеспечения биобезопасности на период до 2025 г. и дальнейшую перспективу является исключение или максимальное снижение использования в технологических процессах патогенных микроорганизмов. Задача актуальна и при обучении специалистов лабораторной диагностике особо опасных инфекций.

В настоящее время для освоения учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы» применяют лишь один авирулентный штамм чумного микроба – *Y. pestis* EV НИИЭГ. Данный штамм используется для вакцинации людей; в соответствии с национальной классификацией отнесен к III группе патогенности, то есть характеризуется средней степенью опасности и в обычных условиях не представляет угрозы для работников лабораторий и населения. Другие штаммы *Y. pestis*, в том числе природные с установленными авирулентными свойствами и генно-инженерно-модифицированные, лишённые ведущих факторов патогенности, продолжают находиться в I группе патогенности [1, 2]. Необходимо заметить, что в Российской Федерации подход к дифференцировке штаммов микроорганизмов одного вида по группам патогенности регламентирован (СП 1.3.3118-13) только для вакцинных штаммов I–III групп патогенности (опасности) и отдельных штаммов *Vibrio cholerae* и *Escherichia coli*. При этом отсутствуют критерии и подходы, позволяющие отнести некоторые авирулентные (кроме вакцинных) штаммы *Y. pestis* к III группе патогенности.

Цель исследования – выбор критериев и методических подходов для перевода авирулентных штаммов возбудителя чумы из I группы патогенности (опасности) в III группу.

Материалы и методы

Проанализированы отечественные и зарубежные нормативные и методические документы, а также научные публикации в области лабораторной диагностики чумы и обеспечения биобезопасности работ с патогенными биологическими агентами.

Результаты и обсуждение

В процессе анализа действующих санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работ с ПБА I–II групп СП 1.3.3118-13, ряда зарубежных руководств и научных публикаций по обеспечению биобезопасности работ с микроорганизмами в лабораториях обнаружены данные об отнесении штаммов микроорганизмов одного вида к разным группам патогенности (табл. 1) [3–5], а также алгоритм изменения группы патогенности, в частности по причине снижения вирулентности или утраты известных генов вирулентности [6].

В действующей на территории Российской Федерации классификации ПБА для аттенуированных штаммов микроорганизмов I–II групп патогенности предусмотрен отдельный подход. При паспортизации их включают в III группу патогенности. Реально это используют для вакцинных штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ, *Brucella abortus* 19 BA, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Bacillus anthracis* СТИ-1, но не распространяют на другие авирулентные штаммы данных видов.

Следует отметить, что в санитарно-эпидемиологических правилах СП 1.3.3118-13 приведены критерии, которые могут быть основанием для пересмотра классификации биологических агентов, а именно новые научные данные относительно патогенности, путей передачи, круга хозяев, методов, а также средств профилактики и лечения. Вместе с тем из установленных критериев преимущественно учитывают риск заражения человека, пути и вероятность передачи возбудителя инфекции от больного человека или объектов окружающей среды, тяжесть клинических проявлений, вероятность летального исхода, а также наличие эффективных мер и средств защиты, профилактики и лечения. При этом, в отличие от зарубежных документов [3, 6], не учитывают современные характеристики конкретных штаммов по основным факторам патогенности. Исключением являются некоторые штаммы *Vibrio cholerae* и *Escherichia coli*. В частности, критериями для отнесения штаммов *Vibrio cholerae* к более безопасной (III) группе патогенности является отсутствие продукции токсина ctx (СП 1.3.3118-13), штаммов *Escherichia coli* – отсутствие продукции веротоксина

Таблица 1 / Table 1

Отнесение штаммов микроорганизмов одного вида к группам патогенности (опасности)
Assignment of microorganism strains of the same species to pathogenicity (hazard) groups

Название вида Species	Группа патогенности (опасности) Pathogenicity (hazard) group		
	Российская Федерация [СП 1.3.3118-13] * Russian Federation [Sanitary Regulations (SR) 1.3.3118-13] *	НИИ [3] *	УК [6] *
<i>Yersinia pestis</i>	I группа – штаммы <i>Y. pestis</i> Group I – <i>Y. pestis</i> strains	3** группа – штаммы <i>Y. pestis</i> (кроме включенных во 2-ю группу) Group 3** – <i>Y. pestis</i> strains (excluding strains from Group II)	3** группа – штаммы <i>Y. pestis</i> Group 3** – <i>Y. pestis</i> strains
	III группа – штамм <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ Group III – <i>Y. pestis</i> EV NIEEG strain	2** группа – штаммы <i>Y. pestis</i> pgm- (лишенные области пигментации 102 kb) и штаммы lcr- (лишенные плазмиды LCR) Group 2** – <i>Y. pestis</i> strains pgm- (deprived of pigmentation region of 102kb) and lcr- strains (deprived of LCR plasmid)	
<i>Vibrio cholerae</i>	II группа – <i>V. cholerae</i> токсигенный, ctxB+ Group II – toxigenic <i>V. cholerae</i> , ctxB+	2** группа – штаммы <i>V. cholerae</i> Group 2** – <i>V. cholerae</i> strains	2** группа – штаммы <i>V. cholerae</i> токсигенные (включая El Tor) Group 2** – <i>V. cholerae</i> strains
	III группа – <i>V. cholerae</i> O1 не токсигенный; <i>V. cholerae</i> non O1(O139) не токсигенный Group III – non-toxigenic <i>V. cholerae</i> O1; non-toxigenic <i>V. cholerae</i> non O1(O139)		
<i>Brucella</i>	II группа – <i>B. melitensis</i> , <i>abortus</i> , <i>suis</i> , <i>ovis</i> , <i>neotomae</i> , <i>canis</i> , <i>ceti</i> , <i>pinnipedialis</i> , <i>microti</i> Group II – <i>B. melitensis</i> , <i>abortus</i> , <i>suis</i> , <i>ovis</i> , <i>neotomae</i> , <i>canis</i> , <i>ceti</i> , <i>pinnipedialis</i> , <i>microti</i>	3** группа – <i>Brucella</i> , включая <i>abortus</i> , <i>canis</i> , <i>suis</i> Group 3** – <i>Brucella</i> , including <i>abortus</i> , <i>canis</i> , <i>suis</i>	3** группа – штаммы <i>B. abortus</i> , <i>canis</i> , <i>suis</i> , <i>melitensis</i> Group 3 – <i>B. abortus</i> , <i>canis</i> , <i>suis</i> , <i>melitensis</i> strains
	III группа – <i>B. abortus</i> 19 BA Group III – <i>B. abortus</i> 19 BA		
<i>Francisella tularensis</i>	II группа – штаммы <i>F. tularensis</i> Group II – <i>F. tularensis</i> strains	3** группа – штаммы <i>F. tularensis</i> (кроме включенных во 2-ю группу) Group 3** – <i>F. tularensis</i> strains (except for strains included in Group 2)	3** группа – штаммы <i>F. tularensis</i> тип A Group 3** – <i>F. tularensis</i> type A strains
	III группа – штамм <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ Group III – <i>F. tularensis</i> 15 NIEEG strain	2** группа – <i>F. tularensis</i> ssp. <i>novicida</i> штамм Utah 112; <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> штамм LVS; <i>F. tularensis</i> bv. <i>tularensis</i> штамм B-38 Group 2** – <i>F. tularensis</i> ssp. <i>novicida</i> strain Utah 112; <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> strain LVS; <i>F. tularensis</i> bv. <i>tularensis</i> strain B-38	2** группа – штаммы <i>F. tularensis</i> тип B Group 2** – <i>F. tularensis</i> type B strains
<i>Escherichia coli</i>	II группа – штаммы <i>E. coli</i> O157:H7, O104:H4 и другие серотипы – продуценты веротоксина Group II – <i>E. coli</i> strains O157:H7, O104:H4 and other serotypes – producers of verotoxin	2** группа – все энтеропатогенные, энтеротоксигенные, энтероинвазивные штаммы, включая <i>E. coli</i> O157:H7 и штаммы с K1 Group 2** – all enteropathogenic, enterotoxigenic, enteroinvasive strains, including <i>E. coli</i> O157:H7 and strains with K1	3** группа – штаммы <i>E. coli</i> O157:H7, O103 – продуценты веротоксина Group 3** – <i>E. coli</i> O157:H7, O103 strains – producers of verotoxin
	IV группа – штаммы <i>E. coli</i> Group IV – <i>E. coli</i> strains	1** группа – штамм <i>E. coli</i> K-12, если (1) не обладает полным ЛПС (т.е. не содержит О-антигена); (2) не содержит активных факторов вирулентности (например, токсинов) или факторов колонизации и генов, кодирующих эти факторы Group 1** – <i>E. coli</i> strains K-12, if (1) does not have complete LPS (i.e. does not contain O-antigen); (2) does not have active virulence factors (for instance, toxins) or colonization factors and genes encoding these factors	2** группа – <i>E. coli</i> , кроме непатогенных штаммов Group 2** – <i>E. coli</i> , except for non-pathogenic strains
<i>Bacillus anthracis</i>	II группа – штаммы <i>B. anthracis</i> Group II – <i>B. anthracis</i> strains	2** группа – штаммы <i>B. anthracis</i> Group 2** – <i>B. anthracis</i> strains	3** группа – штаммы <i>B. anthracis</i> Group 3** – <i>B. anthracis</i> strains
	III группа – штамм <i>B. anthracis</i> СТИ-1 Group III – <i>B. anthracis</i> STI-1 strain		

* – ссылки на источники литературы.

** – нумерация групп патогенности, принятая ВОЗ и рядом зарубежных стран.

* – references.

** – numbering of pathogenicity groups adopted by WHO and a some foreign states.

или факторов колонизации или генов, их кодирующих, а также полного ЛПС [СП 1.3.3118-13, 3, 6]. Однако в отечественных нормативно-методических документах и литературных источниках не обнаружено критериев для изменения группы патогенности

авирулентных штаммов возбудителя чумы. Вместе с тем за рубежом имеется опыт перевода в другую группу патогенности штаммов *Y. pestis*, лишенных области пигментации 102 т.п.н. (pgm⁻) и плазмиды pCad (*lcrV*) [3].

В настоящее время накоплены обширные научные данные, позволяющие на уровне генома оценить вирулентные свойства штаммов *Y. pestis*. Как известно, вирулентность – индивидуальный признак отдельного штамма, а мера ее проявляется в способности микроорганизма проникать в органы и ткани, размножаться в них, вырабатывать вещества, которые могут подавлять защитные силы макроорганизма [7]. Присутствие всего комплекса продуцируемых факторов и генов, их кодирующих, свидетельствует о потенциально высокой вирулентности штамма микроорганизма. Отсутствие одного или нескольких факторов приводит к снижению или авирулентности штаммов.

Ведущее значение в реализации вирулентных свойств *Y. pestis* имеют гены, локализованные на плазмиде pCad и хромосомной «области пигментации». Отсутствие в геноме хотя бы одной из основных детерминант патогенности (плазмиды pCad или области *pgm*) приводит к авирулентности штамма [8–12].

Для выявления факторов патогенности используют микробиологический, молекулярно-генетические и биологический методы, регламентированные в МУ 4.2.2940-11. Микробиологический метод обеспечивает возможность фенотипически выявить функционирование основных факторов патогенности. Культивирование штаммов *Y. pestis* на магниевом-оксалатном агаре позволяет оценить наличие плазмиды кальцийзависимости (Cad-фенотип) в геноме возбудителя чумы, установить ее функционирование и, как следствие, дифференцировать потенциально вирулентные штаммы (Cad⁺) от авирулентных (Cad⁻). Потенциально вирулентные штаммы демонстрируют рост клеток чумного микроба только при 28 °С, авирулентные – при 37 °С. Выявление признака пигментсорбции (Pgm-фенотип) косвенно свидетельствует о наличии и функционировании генов *hms* оперона. Потенциально вирулентные штаммы *Y. pestis* проявляют способность формировать при культивировании на питательной среде с гемин (среда Джексона-Берроуза) мелкие пигментированные колонии (Pgm⁺), а авирулентные – более крупные, бесцветные (Pgm⁻).

Современные молекулярно-генетические методы позволяют получать информацию о генах, кодирующих биологические свойства [13]. В лабораторной диагностике чумы широко практикуют ПЦР, результаты которой дают возможность установить наличие или отсутствие генов, ассоциированных с вирулентностью и, как следствие, дифференцировать штаммы на потенциально вирулентные или авирулентные [14]. Такими ДНК-мишенями ПЦР-анализа являются гены *ybt*-региона, *irp2* – острова NPI; *lcrV* – плаزمиды pCad, которая кодирует и другие факторы патогенности, в том числе эффекторный белок Yops [15–16].

Однако подтвердить вирулентность штамма и дать ее количественную оценку возможно только применяя биологический метод исследования с использованием высокочувствительных лабораторных

животных [17]. Штаммы основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis* обладают высокой вирулентностью и эпидемическим потенциалом для людей и грызунов, к ним одинаково чувствительны морские свинки и белые мыши. Штаммы *Y. pestis* неосновных подвигов (*ulegeica*, *hissarica*, *altaica*, *caucasica*) проявляют избирательную вирулентность – вирулентны для мышей, авирулентны для морских свинок [18]. В настоящее время в Российской Федерации вирулентность характеризуют в соответствии с количественными критериями, полученными при подкожном заражении белых мышей: высоковирулентные штаммы – LD₅₀ от 5 до 10 м.к., слабовирулентные штаммы – LD₅₀ более 1·10⁵ м.к., авирулентные штаммы – LD₅₀ более 1·10⁶ м.к. [17].

Принимая во внимание молекулярно-генетические основы вирулентности штаммов *Y. pestis*, фенотипические проявления функционирования основных факторов патогенности, количественное определение вирулентных свойств штаммов с использованием высокочувствительных биопробных животных и требования санитарных правил СП 1.3.3118-13 и МУ 3.4.2552-09, нами был предложен комплекс критериев для отнесения штамма *Y. pestis* к III группе патогенности. А именно:

- авирулентность для белых мышей при подкожном заражении (LD₅₀ более или равна 10⁷ КОЕ). Вирулентность штамма не должна превышать LD₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, включенного в III группу патогенности, следовательно, в соответствии с действующими МУ 3.31.1113-02 должна быть более или равна 10⁷ КОЕ;

- отсутствие генов, ответственных за выработку основных факторов патогенности (pCad, область *pgm*), или одного из них;

- отсутствие фенотипических проявления *in vitro* продукции основных факторов патогенности (Pgm⁻, Cad⁻);

- наличие чувствительности к антибактериальным препаратам, регламентированным (МУ 3.4.2552-09) для экстренной профилактики и лечения чумы.

Таким образом, предлагаемый методический подход включает комплексное исследование штамма чумного микроба для выявления генов, кодирующих основные детерминанты патогенности, фенотипических проявлений функционирования данных генов, а также оценку показателя вирулентности (LD₅₀) для белых мышей при подкожном заражении.

Разработанный подход апробирован нами на наборе штаммов, сформированном сотрудниками отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» для освоения учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы» [19]. В проведенных ранее исследованиях выбор штаммов *Y. pestis* осуществляли в соответствии с перечнем критериев, обусловленных учебными планами, необходимыми профессиональными компетенциями и правилами обеспечения биобезопасности. Одним из основных критериев,

актуальным для индивидуальной работы слушателей курсов на практических занятиях, обозначена авирулентность. Биологические свойства штаммов *Y. pestis* учебного набора охарактеризованы с помощью регламентированных методов и зарегистрированных медицинских изделий для *in vitro* диагностики (табл. 2). В качестве штаммов сравнения использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ и высоковирулентный штамм *Y. pestis* 231 (708).

В учебный набор входят восемь авирулентных штаммов чумного микроба, у которых по генетическим и фенотипическим характеристикам отсутствуют плазмиды pCad и/или «остров высокой патогенности» в составе *pgm* области хромосомы, а LD₅₀ для белых мышей составляет более 10⁸ КОЕ, а также *Y. pestis* 652 «Гризель», включающий оба фактора патогенности и имеющий LD₅₀, равный 2,15·10⁶ КОЕ. Основанием для включения последнего штамма в данный набор явились действующие количественные показатели вирулентности для белых мышей, согласно которым штамм при значении LD₅₀ более

10⁶ КОЕ является авирулентным [18]. До настоящего времени окончательную оценку вирулентности штаммов *Y. pestis* проводят по показателю LD₅₀. Анализ научных публикаций и методических документов выявил отсутствие единых количественных критериев для дифференциации штаммов *Y. pestis* по вирулентности (табл. 3). В то же время результаты определения LD₅₀ зависят от многих факторов – метода заражения, вида животного, его возраста, веса, упитанности и других причин. В связи с этим следует отметить актуальность пересмотра формализованных критериев для дифференциации штаммов чумного микроба по вирулентности с использованием лабораторных животных [17, 18].

В результате оценки 9 авирулентных штаммов чумного микроба, включенных в учебный набор, с применением комплекса критериев для отнесения к III группе патогенности установлено, что:

- критерию «авирулентность для белых мышей» соответствуют 8 штаммов, исключение составил *Y. pestis* 652 «Гризель»;

Таблица 2 / Table 2

Результаты оценки патогенных свойств штаммов *Y. pestis* учебного набора [20]
Results of assessment of pathogenic properties in *Y. pestis* strains from the training kit [20]

Свойства штаммов Properties of strains	Штамм <i>Y. pestis</i> <i>Y. pestis</i> strain									
	231(708)	EV НИИЭГ EV NIEG	707 «Касуга» 707 "Kasuga"	521 (2101)	A-819	100P6 (36M5)	M-1813	KM 260 (12)	KM-130 (3)	707 «Гризель» 707 "Grizel"
Генетические особенности Genetic peculiarities	Наличие генов Presence of genes									
	<i>pla</i> <i>cafI</i> <i>lcrV</i> <i>hmsH</i> <i>irp2</i> область 3a (3a region)	<i>pla</i> <i>cafI</i> <i>lcrV</i> область 3a (3a region)	<i>pla</i> <i>cafI</i> <i>hmsH</i> <i>irp2</i> область 3a (3a region)	<i>pla</i> <i>cafI</i> <i>lcrV</i> область 3a (3a region)	<i>cafI</i> область 3a (3a region)	<i>pla</i> <i>cafI</i> <i>lcrV</i> область 3a (3a region)	<i>pla</i> <i>cafI</i> <i>lcrV</i> область 3a (3a region)	<i>hmsH</i> <i>irp2</i> область 3a (3a region)	<i>cafI</i> область 3a (3a region)	<i>cafI</i> <i>hmsH</i> <i>irp2</i> <i>lcrV</i> область 3a (3a region)
	Отсутствие генов Absence of genes									
	-	<i>hmsH</i> <i>irp2</i>	<i>lcrV</i>	<i>hmsH</i> <i>irp2</i>	<i>hmsH</i> <i>irp2</i> <i>lcrV</i> <i>pla</i>	<i>hmsH</i> <i>irp2</i>	<i>hmsH</i> <i>irp2</i>	<i>lcrV</i> <i>pla</i> <i>cafI</i>	<i>hmsH</i> <i>irp2</i> <i>lcrV</i> <i>pla</i>	<i>pla</i>
LD ₅₀ для белых мышей, КОЕ LD ₅₀ for white mice, CFU	12,5 КОЕ 12,5 CFU	>10 ⁹	1·10 ⁹	>10 ⁹	>10 ⁹	1,47·10 ⁸	1·10 ⁸	>10 ⁹	>10 ⁹	2,15·10 ⁶
Способность к пигментсорбции Pigment sorption capacity	Pgm ⁺	Pgm ⁻	Pgm ⁺	Pgm ⁻	Pgm ⁻	Pgm ⁻	Pgm ⁻	Pgm ⁺	Pgm ⁻	Pgm ⁺
Зависимость роста штаммов от ионов кальция Calcium-dependence	Cad ⁺	Cad ⁺	Cad ⁻	Cad ⁺	Cad ⁻	Cad ⁺	Cad ⁺	Cad ⁻	Cad ⁻	Cad ⁺
Цитотоксическое воздействие штаммов на лейкоциты цельной крови человека, % Cytotoxic effect of strains on leucocytes of whole human blood, %	91,33±4,56	24±0,19	44,33±7,35	2,66±0,33	49±2,94	30,33±1,73	41,66±5,07	18±2,35	10±3,27	76,66±7,65

Таблица 3 / Table 3

Дифференциация штаммов *Y. pestis* по вирулентностиDifferentiation of *Y. pestis* strains by virulence

Вирулентность штамма Strain virulence	LD ₅₀ м.к. (microbe cells)		
	[20]*	[18]*	[17]*
Высоковирулентный Highly virulent	10	от 1 до 100	от 5 до 10
Вирулентные Virulent	-	от 101 до 1000	-
Средневирулентные Moderately virulent	-	от 1001 до 10000	-
Слабовирулентный Slightly virulent	> 10 ⁵	> 10 ⁵	> 10 ⁵
Авирулентным Avirulent	> 10 ⁶	-	> 10 ⁶

* – ссылки на источники литературы.

* – references.

- критерию «отсутствие генов, кодирующих основные факторы патогенности» – 8 штаммов (оба фактора – 2, pCad – 2, pgm – 4), исключение составил *Y. pestis* 652 «Гризель»;

- критерию «отсутствие фенотипических проявлений продукции обоих или одного из основных факторов патогенности» – 8 штаммов (6 штаммов – (Pgm–), 4 – (Cad–)), исключение составил *Y. pestis* 652 «Гризель»;

- критерию «наличие чувствительности к антибактериальным препаратам» – 9 штаммов.

Таким образом, в результате анализа показано, что штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ соответствует всем предложенным критериям. Для семи авирулентных штаммов *Y. pestis*, включенных в учебный набор, установлено наличие оснований для отнесения к III группе патогенности: *Y. pestis*: 707 «Касуга», 521 (2101), A-819, 100P6 (36M5), KM-130 (3), KM 260 (12), M-1813.

Для характеристики патогенных свойств наряду с данными регламентированных методов были использованы результаты оценки *in vitro* интенсивности цитотоксического воздействия штаммов чумного микроба на лейкоциты цельной крови человека, имеющие высокую корреляцию с биологическим методом ($r_s=0,9$ – для авирулентных штаммов; $r_s=0,7$ – для вирулентных штаммов) [21]. Отмечено, что вирулентные штаммы *Y. pestis* (pCad⁺, pgm⁺) обладали более выраженным повреждающим эффектом на лейкоциты цельной крови человека (гибель более 80 % клеток в исследуемом образце крови) в условиях *in vitro* (табл. 2). Штаммы, утратившие оба (pCad, область pgm) или один из основных факторов патогенности и по значению LD₅₀ характеризовавшиеся авирулентностью, не индуцировали массивную гибель лейкоцитов (гибель менее 50 % клеток). Исключение составил штамм *Y. pestis* 652 «Гризель» (LD₅₀ равно 2,15·10⁶ КОЕ), имевший высокий показатель цитотоксичности (76,77±7,65 %). Возможно, это объясняется наличием в геноме обязательных де-

терминант патогенности (pCad⁺, pgm⁺). Полученные молекулярно-генетические характеристики основных факторов патогенности и цитотоксичности данного штамма свидетельствуют о нецелесообразности отнесения его к группе авирулентных, несмотря на формальное соответствие критерию LD₅₀ более 10⁶ м.к.

Таким образом, оценка вирулентности штамма *Y. pestis* должна опираться на комплексную характеристику основных факторов патогенности с помощью современных молекулярно-генетических методов исследования, данных о фенотипических проявлениях их функционирования, а также степени патогенности для белых мышей. Данный подход в перспективе позволит избежать многократных пассажей культуры чумного микроба на лабораторных животных с целью доказательства отсутствия реверсии в вирулентную форму и получения сравнимых данных.

Актуальной задачей является пересмотр используемых количественных показателей для дифференциации штаммов чумного микроба по вирулентности с учетом показателя LD₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, который в соответствии с действующими МУ 3.31.1113-02 должен быть не менее 10⁷ КОЕ.

Целесообразно дополнять комплексный подход информативными методами исследования, в частности характеристикой цитотоксичности штамма, продемонстрировавшей высокую корреляцию с критерием вирулентности LD₅₀.

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

Список литературы

1. Дроздов С.Г., Гарин Н.С., Джинджоян Л.С., Тарасенко В.М. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. АМН СССР. М.: Медицина; 1987. 255 с.
2. Зверев В.В., Быков А.С., редакторы. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник. М.: Медицинское информационное агентство; 2016. С. 394–5.
3. NIH Guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules. 2019. [Электронный ресурс]. URL: https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/NIH_Guidelines.html (дата обращения 24.06.19).
4. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, fifth edition. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetyMicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2009-P.PDF> (дата обращения 25.06.19).
5. Tian D., Zheng T. Comparison and Analysis of Biological Agent Category Lists Based On Biosafety and Biodefense. *PLoS One*. 2014; 9(6):e101163. DOI: 10.1371/journal.pone.0101163.
6. The Approved List of biological agents. HSE Books; 2013. 35 p. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.hse.gov.uk/PuBns/misc208.pdf> (дата обращения 24.06.19).
7. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология: учебник. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008. С. 192–3.
8. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение I. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2002; 3:3–23.
9. De Almeida, A.M. Guiole A., Guilvout I., Iteman I., Baranton G., Carniel E. Chromosomal irp 2 gene in *Yersinia*: distribution, expression, deletion and impact on virulence. *Microb. Pathog.* 1993; 14(1):9–21. DOI: 10.1006/mpat.1993.1002.
10. Iteman I., Guiole A., De Almeida A.M., Guilvout I., Baranton G., Carniel E. Relationship between loss of pigmentation and deletion of the chromosomal iron-regulated irp2 gene in *Yersinia*

pestis: evidence for separate but related events. *Infect. Immun.* 1993; 61(6):2717–22. PMID: 8500913. PMCID: PMC280907.

11. Nakajima R., Brubaker R.R. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 1993; 61(1):23–31. PMID: 8418045. PMCID: PMC302683.

12. Ракин А. Остров «высокой патогенности»: продукция металлофора йерсиниобактина, интегративность, мобильность. *Бактериология*. 2017; 2(4):7–16. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-7-16.

13. Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарапова Н.А., Черкасов А.В. Современные методы секвенирования ДНК (обзор). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; 2:73–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-2-73-79.

14. Попов Ю.А., Ерошенко Г.А., Булгакова Е.Г., Смирнова Н.И. Разработка комплексного алгоритма генотипирования и методов оценки генетического разнообразия природных штаммов возбудителей чумы и холеры. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009; 4:5–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-4(102)-5-10.

15. Куклев В.Е., Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Кутырев В.В. Набор и способ для ускоренной идентификации чумного микроба с одновременной дифференциацией вирулентных и авирулентных штаммов *Y. pestis*, определением их плазмидного профиля. Патент РФ № 2473701, опубл. 27.01.2013. Бюл. № 3.

16. Leal N.C., Almeida A.M. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.* 1999; 41(6):339–42. DOI: 10.1590/s0036-46651999000600002.

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

18. Апарин Г.П., Голубинский Е.П. Микробиология чумы: руководство. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та; 1989. 89 с.

19. Сазанова Е.В., Малиюкова Т.А., А.В. Бойко, Н.И. Вахрушина, Ю. А. Попов. Набор учебных штаммов для освоения лабораторной диагностики чумы. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2017; 5(22):22–7.

20. Burrows T.W. Virulence of *pasteurella pestis* and immunity to plague. *Ergeb. Mikrobiol. Immunitätsforsch. Exp. Ther.* 1963; 37:59–113. DOI: 10.1007/978-3-662-36742-1_2.

21. Сазанова Е.В., Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Малиюкова Т.А., Попов Ю.А. Проточно-цитофлуориметрический анализ цитотоксичности штаммов *Yersinia pestis*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 6:3–9. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-6-3-9.

References

1. Drozdov S.G., Garin N.S., Dzhindoyan L.S., Tarasenko V.M. [Basic Principles of Occupational Safety in Microbiological and Virological Laboratories]. Academy of Medical Sciences of USSR. M.: “Meditsina”; 1987. 255 p.

2. Zverev V.V., Bykov A.S., editors [Medical Microbiology, Virology and Immunology: Study Guide]. M.: “Medical Information Agency”; 2016. P. 394–5.

3. NIH Guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules. 2019. (Cited 24 June 2019). [Internet]. Available from: https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/NIH_Guidelines.html.

4. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, fifth edition. (Cited: 25 June 2019). [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetyMicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2009-P.PDF>.

5. Tian D., Zheng T. Comparison and Analysis of Biological Agent Category Lists Based On Biosafety and Biodefense. *PLoS One*. 2014; 9(6):e101163. DOI: 10.1371/journal.pone.0101163.

6. The Approved List of biological agents. HSE Books; 2013. 35 p. (Cited 24 June 2019). [Internet]. Available from: <https://www.hse.gov.uk/PuBns/misc208.pdf>.

7. Pokrovsky V.I., Pak S.G., Briko N.I., Danilkin B.K. [Infectious Diseases and Epidemiology: Textbook, 2nd edition]. M.: “GEOTAR-Media”; 2008. P. 192–3.

8. Anisimov A.P. [*Yersinia pestis* factors, assuring circulation and maintenance of the plague pathogen in natural foci ecosystems. Report 1]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2002; 3:3–23.

9. De Almeida, A.M. Guiyole A., Guilvout I., Itean I., Baranton G., Carniel E. Chromosomal *irp 2* gene in *Yersinia*: distribution, expression, deletion and impact on virulence. *Microb. Pathog.* 1993; 14(1):9–21. DOI: 10.1006/mpat.1993.1002.

10. Itean I., Guiyole A., De Almeida A.M., Guilvout I., Baranton G., Carniel E. Relationship between loss of pigmentation and deletion of the chromosomal iron-regulated *irp2* gene in *Yersinia pestis*: evidence for separate but related events. *Infect. Immun.* 1993; 61(6):2717–22. PMID: 8500913. PMCID: PMC280907.

11. Nakajima R., Brubaker R.R. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 1993; 61(1):23–31. PMID: 8418045. PMCID: PMC302683.

12. Rakin A. [“High pathogenicity” island: yersiniabactin metallophore production, integration, mobility]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2017; 2(4):7–16. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-7-16.

13. Krasnov Y.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., Cherkasov A.V. [Modern Methods of DNA Sequencing (Scientific Review)]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2014; (2):73–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-2-73-79.

14. Popov Yu.A., Eroshenko G.A., Bulgakova E.G., Smirnova N.I. [Development of Complex Genotyping Algorithm and Methods of Evaluation of the Genetic Diversity of Plague and Cholera Agents Natural Strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2009; 4(102):5–10. (In Russ.) DOI: 10.21055/0370-1069-2014-2-73-79.

15. Kuklev V.E., Osina N.A., Bugorkova T.V., Kutyrev V.V. [The kit and method for express identification of plague microbe with simultaneous differentiation of virulent and avirulent *Y. pestis* strains, with determination of their plasmid profile]. RF Patent No 2473701, published on January 27, 2013. Bulletin No 3.

16. Leal N.C., Almeida A.M. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.* 1999; 41(6):339–42. DOI: 10.1590/s0036-46651999000600002.

17. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Infectious Diseases. Practice Guidelines]. M.: “Shiko” CJSC; 2013. 560 p.

18. Aparin G.P., Golubinsky E.P. [Microbiology of Plague: Guidelines]. Irkutsk: Irkutsk University Publishing House; 1989. 89 p.

19. Sazanova E.V., Malyukova T.A., Boyko A.V., Vakhrušina N.I., Popov Yu.A. [A kit of practice strains for mastering laboratory diagnostics of plague]. *Infektsionnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2017; 5(22):22–7.

20. Burrows T.W. Virulence of *pasteurella pestis* and immunity to plague. *Ergeb. Mikrobiol. Immunitätsforsch. Exp. Ther.* 1963; 37:59–113. DOI: 10.1007/978-3-662-36742-1_2.

21. Sazanova E.V., Shmelkova T.P., Kravtsov A.L., Malyukova T.A., Popov Yu.A. [Flow-cytofluorimetric analysis of cytotoxicity of *Yersinia pestis* strains]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2017; 6:3–9. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-6-3-9.

Authors:

Sazanova E.V., Malyukova T.A., Popova Yu.A., Lyapin M.N. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Сазанова Е.В., Малиюкова Т.А., Попова Ю.А., Ляпин М.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-146-149

УДК 616.98:578.2

И.В. Бакштановская¹, Т.Ф. Степанова¹, Г.В. Шарухо², А.Н. Летюшев^{1,2}, К.Б. Степанова¹,
Н.В. Логинова³, Ц.А. Панина¹, Е.А. Зматракова¹, А.Н. Косырева¹, А.З. Бартусевич¹, С.А. Леонтьева¹,
А.О. Вишнякова¹

РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЯВЛЕНИЯ SARS-CoV-2 И ДРУГИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ МЕТОДОМ ПЦР В ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии», Тюмень, Российская Федерация;

²Управление Роспотребнадзора по Тюменской области, Тюмень, Российская Федерация;

³Департамент здравоохранения Тюменской области, Тюмень, Российская Федерация

Целью настоящей работы являлось выявление возбудителей внебольничных пневмоний и ко-инфицирования с помощью исследования биоматериала от пациентов методом ПЦР. **Материалы и методы.** Проведено исследование 268 проб от 258 пациентов методом ПЦР для выявления РНК/ДНК возбудителей респираторных инфекций вирусной и бактериальной природы. **Результаты и обсуждение.** В 43,3 % проб выявлена РНК SARS-CoV-2, в 4,5 % – РНК/ДНК возбудителей ОРВИ, в одной пробе – ДНК *Mycoplasma pneumoniae*. Ко-инфекция обнаружена только у пациентов противотуберкулезного диспансера (SARS-CoV-2 с микобактериями туберкулеза). У обследованных больных пневмонией РНК SARS-CoV-2 существенно чаще выявлялась в биоматериале из нижних дыхательных путей (52 %), чем в респираторных мазках (8,5 %). В первую неделю от начала заболевания обнаружено 19,2 % положительных проб, во вторую – 56,5 %.

Ключевые слова: пневмония, ПЦР, SARS-CoV-2, ко-инфекции.

Корреспондирующий автор: Бакштановская Ирина Владимировна, e-mail: BakshtanovskayaIV@tniikp.rosпотребнадзор.ru.

Для цитирования: Бакштановская И.В., Степанова Т.Ф., Шарухо Г.В., Летюшев А.Н., Степанова К.Б., Логинова Н.В., Панина Ц.А., Зматракова Е.А., Косырева А.Н., Бартусевич А.З., Леонтьева С.А., Вишнякова А.О. Результаты выявления SARS-CoV-2 и других возбудителей внебольничных пневмоний методом ПЦР в Тюменской области. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:146–149. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-146-149

Поступила 14.09.20. Принята к публ. 16.09.20.

I.V. Bakshtanovskaya¹, T.F. Stepanova¹, G.V. Sharukho², A.N. Letyushev^{1,2}, K.B. Stepanova¹,
N.V. Loginova³, Ts.A. Panina¹, E.A. Zmatrakova¹, A.N. Kosyreva¹, A.Z. Bartusevich¹, S.A. Leont'eva¹,
A.O. Vishnyakova¹

Results of Detecting SARS-CoV-2 and Other Pathogens of Community-Acquired Pneumonia by PCR in the Tyumen Region

¹Tyumen Research Institute of the Regional Infection Pathology, Tyumen, Russian Federation;

²Rospotrebnadzor Administration in the Tyumen Region, Tyumen, Russian Federation;

³Department of Health of the Tyumen Region, Tyumen, Russian Federation

Abstract. The aim of this work was to identify the causative agent of community-acquired pneumonia and co-infection using PCR study of biomaterial from patients. **Materials and methods.** PCR testing of 268 samples from 258 patients was carried out to identify RNA/DNA of viral and bacterial pathogens of respiratory infections. **Results and discussion.** In 43.3 % of samples SARS-CoV-2 RNA was detected, in 4.5 % – RNA/DNA of acute respiratory viral infections pathogens, in one sample – DNA of *Mycoplasma pneumoniae*. Co-infection was detected only in patients of the anti-tuberculosis dispensary (SARS-CoV-2 and *Mycobacterium tuberculosis*). In the examined patients with pneumonia, SARS-CoV-2 RNA was significantly more often detected in biomaterial from the lower respiratory tract (52 %) than in respiratory smears (8.5 %). In the first week from the onset of the disease, 19.2 % of positive samples were found, in the second – 56.5 %.

Key words: pneumonia, PCR, SARS-CoV-2, co-infections.

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

Corresponding author: Irina V. Bakshtanovskaya, e-mail: BakshtanovskayaIV@tniikp.rosпотребнадзор.ru.

Citation: Bakshtanovskaya I.V., Stepanova T.F., Sharukho G.V., Letyushev A.N., Stepanova K.B., Loginova N.V., Panina Ts.A., Zmatrakova E.A., Kosyreva A.N., Bartusevich A.Z., Leont'eva S.A., Vishnyakova A.O. Results of Detecting SARS-CoV-2 and Other Pathogens of Community-Acquired Pneumonia by PCR in the Tyumen Region. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:146–149. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-146-149

Received 14.09.20. Revised Accepted 16.09.20.

Bakshtanovskaya I.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1365-7741>

Stepanova T.F., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6289-6274>

Sharukho G.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0772-8224>

Letyushev A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4185-9829>

Stepanova K.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5420-0919>

Panina Ts.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2490-4592>

Zmatrakova E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8917-1900>

Kosyreva A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9332-5829>

Bartusevich A.Z., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5728-2382>

Leont'eva S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9426-5135>

Vishnyakova A.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0008-3788>

Для заболевания, вызываемого новым коронавирусом (SARS-CoV-2), характерно преимущественное поражение нижних дыхательных путей. Входными воротами возбудителя являются эпителий верхних дыхательных путей и эпителиоциты желудка и кишечника. Начальным этапом заражения является проникновение SARS-CoV-2 в клетки-мишени, имеющие рецепторы ангиотензинпревращающего фермента II типа, при этом основной и быстро достижимой мишенью являются альвеолярные клетки II типа легких, что определяет развитие пневмонии [1].

В условиях распространения COVID-19 к приоритетам первого уровня при организации исследований и противоэпидемических мероприятий относится проведение лабораторных исследований у лиц с диагнозом «внебольничная пневмония» (СП 3.1.3597-20 «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19)»).

Вариативность и динамическое изменение рентгенологической картины пневмонии, вызванной SARS-CoV-2, может затруднять дифференциальную диагностику с пневмониями, вызванными другими возбудителями, поэтому у пациентов с тяжелым течением вирусной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2, актуально изучение различных вариантов ко-инфицирования (бактериальными, грибковыми патогенами, другими вирусами) [1]. Показано, что ко-инфицирование несколькими вирусами выявлялось у 3 % заболевших, наиболее часто у них изолировали респираторно-синцитиальный вирус (16,9 %) и грипп типа А (15,5 %) [2]. Авторы одного из исследований, проведенных в США (Калифорния), в пятой части SARS-CoV-2-положительных образцов обнаруживали прочие возбудители респираторных инфекций, наиболее часто выявляли риновирусы (7 %), респираторно-синцитиальный вирус (5 %) и отличные от SARS-CoV-2 коронавирусы (4 %) [3]. Поскольку инфекционные агенты вирусной природы играют ведущую роль в структуре инфекционных заболеваний неясной этиологии, мониторинг известных вирусных патогенов – важный аспект эпидемиологического надзора, необходимый для своевременного реагирования на возникающие угрозы [4]. Ко-инфекции способны приводить к увеличению летальности, в связи с чем дифференциальная диагностика пневмоний, вызванных SARS-CoV-2, с выявлением других патогенов, представляется актуальной задачей.

На территории Тюменской области за 28 недель 2020 г. зарегистрировано 8235 случаев внебольничных пневмоний, что на 33,9 % выше, чем в аналогичном периоде 2019 г. (6147 сл.). Уровень кумулятивной заболеваемости на 28-ю неделю составил 542,2 на 100 тыс. населения и превысил в 1,9 раза среднепогодный показатель (СМП 2017–2019 – 287,8). Всего на 14.07.2020 г. с диагнозом «внебольничная пневмония» госпитализировано 4950 человек (60,1 %), из них у 3564 человек проведены исследования для уточнения возбудителя, охват обследованием составил 83,6 %. Выявлено 1068 возбудителей, частота

выявления патогенного агента составила 25,8 %. В структуре выявленных возбудителей первое место занимали вирусы негриппозной этиологии – 556 (52,1 %). Далее по мере убывания другие бактериальные патогенные агенты – 406 (38,0 %), пневмококки – 73 (6,8 %), вирусы гриппа – 19 (1,8 %), микоплазмы – 11 (1,1 %). Доля расшифрованных случаев ВП от числа госпитализированных составила 21,6 %.

В связи с поручением Руководителя Роспотребнадзора (письмо Роспотребнадзора № 02/7045-2020-26 от 15.04.2020), в соответствии с пунктом 2 перечня поручений Правительства Российской Федерации от 8 апреля 2020 г. № ММ-П13-3019кв по итогам заседания президиума Координационного совета при Правительстве Российской Федерации по борьбе с распространением новой коронавирусной инфекции на территории Российской Федерации 8 апреля 2020 г. с целью установления причины заболевания (возбудителя) при госпитализации в медицинскую организацию граждан с подозрением на пневмонию или с подтвержденной пневмонией ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора с 16.04.2020 г. организовал получение от медицинских организаций проб биоматериала и проводит их лабораторное исследование методом ПЦР и бактериологическими методами с применением масс-спектрометрии.

Издан совместный приказ Управления Роспотребнадзора по Тюменской области, ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора и Департамента здравоохранения Тюменской области № 73/41/о/309 от 13.05.2020 г. «Об этиологической расшифровке случаев заболевания внебольничными пневмониями в Тюменской области», в соответствии с которым руководители медицинских организаций, оказывающих медицинскую помощь (стационарную и амбулаторную) больным с диагнозом «внебольничная пневмония», обеспечивают забор и доставку биологического материала, а институт – лабораторные исследования поступившего материала по установлению возбудителя.

В институт поступают образцы биоматериала из моногоспиталей, организованных на базе медицинских организаций области, медицинских учреждений и поликлиник г. Тюмени.

Целью настоящей работы являлось выявление возбудителей внебольничных пневмоний и ко-инфицирования с помощью исследования методом ПЦР биоматериала от пациентов с подозрением на COVID-19.

Материалы и методы

Проведено исследование 268 проб от 258 пациентов: 214 проб мокроты и бронхоальвеолярного лаважа, 47 проб респираторных мазков, 7 проб мочи.

В соответствии с Временными методическими рекомендациями МЗ РФ по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции, для проведения дифференциальной диагностики у всех

заболевших проводили исследования методом ПЦР на возбудители респираторных инфекций: вирусы гриппа типа А и В, респираторно-синцитиальный вирус, вирусы парагриппа, риновирусы, аденовирусы, человеческие метапневмовирусы, MERS-CoV [5], а также микробиологическую диагностику и/или ПЦР диагностику на *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type B, *Legionella pneumophila*, а также иные возбудители бактериальных респираторных инфекций нижних дыхательных путей.

Поступившие пробы исследовали методом ПЦР для выявления РНК/ДНК следующих возбудителей:

1. коронавирус SARS-CoV-2 – тест-системами Вектор-ПЦР-2019-nCoV-RG (ГНЦ «Вектор», р.п. Кольцово), Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG (ГНЦ «Вектор», р.п. Кольцово) и SARS-CoV-2/SARS-CoV (ДНК-технология);

2. коронавирусы, вызывающие тяжелую респираторную инфекцию, MERS-CoV и SARS-CoV;

3. микобактерии туберкулеза;

4. возбудители ОРВИ: респираторно-синцитиальный вирус (human Respiratory Syncytial virus – hRSv), метапневмовирус (human Metapneumovirus – hMpv), вирусы парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (human Parainfluenza virus-1-4 – hPiv), коронавирусы (human Coronavirus – hCov), риновирусы (human Rhinovirus – hRv), аденовирусы групп В, С и Е (human Adenovirus В, С, Е – hAdv), бокавирус (human Bocavirus – hBov);

5. вирусы гриппа А и вирусы гриппа В;

6. вирус гриппа А субтип А/Н1N1(sw2009);

7. вирус гриппа А субтип H5N1;

8. вирус гриппа А субтипы H1N1 и H3N2;

9. возбудители коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*);

10. *Legionella pneumophila*;

11. *Listeria monocytogenes*;

12. *Brucella spp.*;

13. *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae* (№ 2–13 – тест-системами производства «АмплиСенс»).

Проводилось также микробиологическое исследование, результаты которого представлены в отдельной публикации [6].

Результаты и обсуждение

В 116 из 268 проб (43,3 %) от пациентов выявлено РНК SARS-CoV-2.

В трех случаях у пациентов обнаружено одновременно наличие РНК SARS-CoV-2 и SARS-CoV. В двух образцах выявлена только РНК SARS-CoV.

В 9 из 14 проб от пациентов противотуберкулезного диспансера обнаружена РНК SARS-CoV-2, в одной – аденовирус. Во всех пробах этих пациентов обнаружена ДНК микобактерий туберкулеза.

РНК возбудителей гриппа в исследованных пробах не обнаружены.

РНК/ДНК возбудителей ОРВИ обнаружены в 12 пробах мокроты и мазков (4,5 %):

- респираторно-синцитиальный вирус (human Respiratory Syncytial virus – hRSv) – 1 проба;

- метапневмовирус (human Metapneumovirus – hMpv) – 1 проба;

- вирусы парагриппа 2 типа (human Parainfluenza virus-1 – hPiv) – 5 проб;

- вирусы парагриппа 4 типа (human Parainfluenza virus-4 – hPiv) – 1 проба;

- коронавирусы NL-63, 229E (human Coronavirus – hCoV) – 4 пробы;

- аденовирусы групп В, С и Е (human Adenovirus В, С, Е – hAdv) – 2 проба.

В двух пробах мокроты обнаружены одновременно РНК вируса парагриппа 2 типа и коронавирусов NL-63, 229E.

В одной пробе выявлено наличие ДНК *Mycoplasma pneumoniae*.

В пробах, где обнаружены возбудители ОРВИ и микоплазмы, РНК SARS-CoV-2 не выявлена.

В двух случаях в пробах мокроты обнаружено сочетание ДНК микобактерий туберкулеза с ДНК аденовирусов (в одном случае) и *Brucella spp.* (во втором).

ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша, бронхисептикоза, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae* не обнаружены.

В весенний период (апрель–май 2020 г.) в 28 из поступивших 98 проб (28 %) выявлено наличие РНК SARS-CoV-2, именно в этот период в пробах без нового коронавируса обнаружены РНК/ДНК возбудителей ОРВИ. В следующие два летних месяца (июнь–июль 2020 г.) среди поступивших 160 проб в 86 (53,8 %) обнаружена РНК SARS-CoV-2, возбудители ОРВИ и гриппа не выявлялись, однократно обнаружена ДНК *Mycoplasma pneumoniae*.

У обследованных нами больных пневмонией РНК SARS-CoV-2 существенно чаще выявлялась в биоматериале из нижних дыхательных путей (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, аспираты из трахеи и бронхов) (52 %, 112 проб из 214), чем в респираторных мазках (8,5 %, 4 из 47 проб). Эти результаты согласуются с литературными данными, свидетельствующими, что SARS-CoV-2 обнаруживается чаще и с более высокими вирусными нагрузками в образцах из нижних дыхательных путей, чем в образцах из верхних дыхательных путей, особенно на поздних этапах инфекции, по-видимому, в связи с активной репликацией SARS-CoV-2 в легких [7]. Во многих работах показано, что оптимальным биологическим материалом для своевременного выявления новой коронавирусной инфекции у пациентов с пневмониями является мокрота [1].

По-видимому, существует и определенная динамика выявления РНК нового коронавируса в мокроте в зависимости от длительности заболевания к моменту забора проб: в первую неделю от начала за-

болевания нами обнаружено 19,2 % положительных проб, во вторую – 56,5 %; при отсчете срока от момента госпитализации PHK SARS-CoV-2 обнаруживалась примерно в половине проб (46,3 % в первую неделю, 58,3 % – во вторую).

Таким образом, в условиях пандемии при установлении этиологии внебольничных пневмоний необходима «ковидная настороженность», особенно в летний период (при низкой вероятности вирусных пневмоний, связанных с ОРВИ). Полученные результаты свидетельствуют, что ко-инфекции выявляются в небольшом проценте случаев, однако для установления этиологического агента необходимо проводить исследования наиболее показательного биоматериала (при пневмониях – из нижних дыхательных путей) и в соответствующие сроки от начала заболевания.

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

Список литературы

1. Базыкина Е.А., Троценко О.Е., Корита Т.В., Балахонцева Л.А., Котова В.О. 2020. Особенности пневмоний, вызванных новым коронавирусом SARS-CoV-2 (Обзор литературы). COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. 23.07.2020. [Электронный ресурс]. DOI: 10.21055/preprints-3111730.
2. Lansbury L., Lim B., Baskaran V., Lim W.S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* 2020; 81(2):266–75. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.05.046.
3. Kim D., Quinn J., Pinsky B., Shah N.H., Brown I. Rates of co-infection between SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. *JAMA.* 2020; 323(20):2085–86. DOI: 10.1001/jama.2020.6266.
4. Хафизов К.Ф., Сперанская А.С., Мацвай А.Д., Шипулин Г.А., Дедков В.Г. Передовые технологии в диагностике вирусных заболеваний неясной этиологии. *Инфекция и иммунитет.* 2020; 10(1):9–25.
5. Александрович Ю.С., Байбарина Е.Н., Баранов А.А., Вишнева Е.А., Зверева Н.Н., Иванов Д.О., Крючко Д.С., Коновалов И.В., Куличенко Т.В., Лобзин Ю.В., Мазанкова Л.Н., Намазова-Баранова Л.С., Петренко Ю.В., Прометной Д.В., Пшениснгов К.В., Ртищев А.Ю., Сайфуллин М.А., Селимзянова Л.Р., Усков А.Н., Федосеенко М.В., Харькин А.В., Чумакова О.В., Эфендиева К.Е., Яковлев А.В. Ведение детей с заболеванием, вызванным новой коронавирусной инфекцией (SARS-CoV-2). *Педиатрическая фармакология.* 2020; 17(2):103–18. DOI: 10.15690/pf.v17i2.2096.
6. Катаева Л.В., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б., Бакштановская И.В., Посоюзных О.В., Ташланова В.В., Карпукхина Н.Ф., Колотова О.Н., Калашникова Ю.Н., Вакарина А.А. Микробиоценоз нижних дыхательных путей при пневмонии, ассоциированной с SARS-CoV-2. COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. 29.07.2020. [Электронный ресурс]. DOI: 10.21055/preprints-3111755.
7. Lu X., Wang L., Sakthivel S.K., Whitaker B., Murray J., Kamili S., Lynch B., Malapati L., Burke S.A., Harcourt J., Tamin A., Thornburg N.J., Villanueva J.M., Lindstrom S. US CDC Real-Time Reverse Transcription PCR Panel for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(8):1654–65. DOI: 10.3201/eid2608.201246.

References

1. Bazykina E.A., Trotsenko O.E., Korita T.V., Balakhontseva L.A., Kotova V.O. 2020. [Features of pneumonia caused by the new coronavirus SARS-CoV-2 (Literature review)]. COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. 27 Jul 2020. [Internet]. DOI: 10.21055/preprints-3111730.
2. Lansbury L., Lim B., Baskaran V., Lim W.S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* 2020; 81(2):266–75. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.05.046.
3. Kim D., Quinn J., Pinsky B., Shah N.H., Brown I. Rates of co-infection between SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. *JAMA.* 2020; 323(20):2085–86. DOI: 10.1001/jama.2020.6266.
4. Khafizov K.F., Speranskaya A.S., Matsvai A.D., Shipulin G.A., Dedkov V.G. [Advanced technologies in the diagnosis of viral diseases of unknown etiology]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2020; 10(1):9–25.
5. Aleksandrovich Yu.S., Baibarina E.N., Baranov A.A., Vishneva E.A., Zvereva N.N., Ivanov D.O., Kryuchko D.S., Konovalov I.V., Kulichenko T.V., Lobzin Yu.V., Mazankova L.N., Namazova-Baranova L.S., Petrenko Yu.V., Prometnoy D.V., Pshenisnov K.V., Rtischev A.Yu., Sayfullin M.A., Selimzyanova L.R., Uskov A.N., Fedoseenko M.V., Khar'kin A.V., Chumakova O.V., Efendieva K.E., Yakovlev A.V. [Management of children with illness caused by a new coronavirus infection (SARS-CoV-2)]. *Pediatricheeskaya Farmakologiya [Pediatric Pharmacology]*. 2020; 17(2):103–18. DOI: 10.15690/pf.v17i2.2096.
6. Kataeva L.V., Stepanova T.F., Stepanova K.B., Bakshtanovskaya I.V., Posoyuznykh O.V., Tashlanova V.V., Karpukhina N.F., Kolotova O.N., Kalashnikova Yu.N., Vakarina A.A. [Microbiocenosis of the lower respiratory tract in pneumonia associated with SARS-CoV-2]. COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. 29 Jul 2020. [Internet]. DOI: 10.21055/preprints-3111755.
7. Lu X., Wang L., Sakthivel S.K., Whitaker B., Murray J., Kamili S., Lynch B., Malapati L., Burke S.A., Harcourt J., Tamin A., Thornburg N.J., Villanueva J.M., Lindstrom S. US CDC Real-Time Reverse Transcription PCR Panel for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(8):1654–65. DOI: 10.3201/eid2608.201246.

Authors:

Bakshtanovskaya I.V., Stepanova T.F., Stepanova K.B., Panina Ts.A., Zmatrakova E.A., Kosyrev A.N., Bartusevich A.Z., Leont'eva S.A., Vishnyakova A.O. Tyumen Research Institute of the Regional Infection Pathology. 147, Respubliki St., Tyumen, 625026, Russian Federation. E-mail: info@tniikip.rosпотребнадзор.ru.
 Sharukho G.V. Rospotrebnadzor Administration in the Tyumen Region. 45-A, Rizhskaya St., Tyumen, 625026, Russian Federation. E-mail: nadzor72@tyumen-service.ru.
 Letyushev A.N. Tyumen Research Institute of the Regional Infection Pathology. 147, Respubliki St., Tyumen, 625026, Russian Federation; e-mail: info@tniikip.rosпотребнадзор.ru. Rospotrebnadzor Administration in the Tyumen Region; 45-A, Rizhskaya St., Tyumen, 625026, Russian Federation; e-mail: nadzor72@tyumen-service.ru.
 Loginova N.V. Department of Health of the Tyumen Region. Tyumen, Russian Federation.

Об авторах:

Бакштановская И.В., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б., Панина Ц.А., Зматракова Е.А., Косырева А.Н., Бартусевич А.З., Леонтьева С.А., Вишнякова А.О. ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора. Российская Федерация, 625026, Тюмень, ул. Республики, 147. E-mail: info@tniikip.rosпотребнадзор.ru.
 Шарухов Г.В. Управление Роспотребнадзора по Тюменской области. Российская Федерация, 625026, Тюмень, ул. Рижская, 45-А. E-mail: nadzor72@tyumen-service.ru.
 Летушев А.Н. Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии; Российская Федерация, 625026, Тюмень, ул. Республики, 147; e-mail: info@tniikip.rosпотребнадзор.ru. Управление Роспотребнадзора по Тюменской области; Российская Федерация, 625026, Тюмень, ул. Рижская, 45-А; e-mail: nadzor72@tyumen-service.ru.
 Логинова Н.В. Департамент здравоохранения Тюменской области. Российская Федерация, Тюмень.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-150-153

УДК 616.932

С.П. Заднова, Д.В. Баданин, Н.А. Плеханов, Т.А. Полунина, Н.В. Котова, А.А. Крицкий,
А.В. Федоров, Я.М. Краснов

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ПРОТЕОМНЫЕ ПРОФИЛИ ТИПИЧНОГО ШТАММА И ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННОГО ВАРИАНТА *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 СЕРОГРУППЫ БИОВАРА ЭЛЬ ТОР

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

Цель работы – выявление различий в продукции белков у типичного штамма и генетически измененного варианта *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор. **Материалы и методы.** В качестве модельных использовали природные штаммы M1062 (Астрахань, 1970 г.) и M1509 (Москва, 2012 г.). Штаммы культивировали на агаре Лурия-Бертани при температуре 37 °С. Электрофорез проводили по методу W.K. Laemmli (1970 г.), масс-спектрометрическое профилирование – согласно методу, описанному A. Shevchenko *et al.* **Результаты и обсуждение.** Масс-спектрометрическое сканирование лизатов клеток исследуемых штаммов показало значительное сходство их протеомов (615 общих белков). Выявленные различия касались повышенной экспрессии у штамма M1062 белков, которые участвуют в биосинтезе ДНК/РНК, входящих в группу «пурины, пиримидины, нуклеозиды», а также регуляторных белков. У штамма M1509 увеличен биосинтез белков, ответственных за патогенез, адаптацию при действии неблагоприятных факторов внешней среды, входящих в группу «кофакторы, витамины, пигменты», участвующих в липидном, углеводном, белковом обменах, клеточных процессах, и белков-транспортёров. Высказано предположение, что широкое распространение геновариантов Эль Тор, возможно, обусловлено повышением патогенных и адаптивных свойств, а также существенной перестройкой метаболизма клеток.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, протеомное сканирование.

Корреспондирующий автор: Заднова Светлана Петровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Заднова С.П., Баданин Д.В., Плеханов Н.А., Полунина Т.А., Котова Н.В., Крицкий А.А., Федоров А.В., Краснов Я.М. Сравнительные протеомные профили типичного штамма и генетически измененного варианта *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор. Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 3:150–153. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-150-153

Поступила 21.10.19. Отправлена на доработку 26.12.19. Принята к публ. 20.01.20.

S.P. Zadnova, D.V. Badanin, N.A. Plekhanov, T.A. Polunina, N.V. Kotova, A.A. Kritsky, A.V. Fedorov,
Ya.M. Krasnov

Comparative Proteomic Profiles of Typical Strain and Genetically Altered Variant of *Vibrio cholerae* O1, Biovar El Tor

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

Abstract. Objective of the study was to identify the differences in the production of proteins in typical strain and genetically altered variant of *V. cholerae* O1, biovar El Tor. **Materials and methods.** Natural strains M1062 (Astrakhan, 1970) and M1509 (Moscow, 2010) were used as model strains in this work. Strains were cultivated on Luria Bertani agar at 37 °C. Electrophoresis was performed in accordance with W.K. Laemmli technique (1970), mass-spectrometric profiling – the method described by A. Shevchenko *et al.* **Results and discussion.** Mass-spectrometric scanning of cell lysates of the examined strains showed significant similarity of their proteomes (615 common proteins). The identified differences pertained to high expression of proteins in the strain M1062, participating in biosynthesis of DNA/RNA, included into “purines, pyrimidines, nucleosides” group, as well as regulatory proteins. In M1509 strain, biosynthesis of the proteins responsible for pathogenesis, adaptation under the influence of unfavorable environmental factors, included into “co-factors, vitamins, pigments” group, involved in lipid, carbohydrate, and protein metabolism, cellular processes, as well as proteins-transporters was increased. It has been suggested that the wide dissemination of El Tor genovariants is probably due to enhanced pathogenic and adaptive properties and also to the considerable transformation of cell metabolism.

Key words: *Vibrio cholerae* biovar El Tor, proteomic scanning.

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

Corresponding author: Svetlana P. Zadnova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Zadnova S.P., Badanin D.V., Plekhanov N.A., Polunina T.A., Kotova N.V., Kritsky A.A., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M. Comparative Proteomic Profiles of Typical Strain and Genetically Altered Variant of *Vibrio cholerae* O1, Biovar El Tor. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2020; 3:150–153. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-150-153

Received 21.10.19. Revised 26.12.19. Accepted 20.01.20.

Zadnova S.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>
Badanin D.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9662-8438>
Plekhanov N.A., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2355-7018>
Polunina T.A., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2234-2760>
Kotova N.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9270-523X>
Kritsky A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>
Fedorov A.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7190-4427>
Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

К настоящему времени известно более 200 серогрупп штаммов *Vibrio cholerae*. Однако только токсигенные штаммы O1 и O139 серогрупп способны вызывать эпидемии и пандемии холеры. При этом штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы на основе биовара – классический и Эль Тор. В результате эволюционных преобразований штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор возникли различные генетически измененные варианты вибрионов Эль Тор (геноварианты) с повышенной вирулентностью, в том числе Матлабские, Мозамбикские и Гаитянские. Основное отличие Эль Тор геновариантов от типичных штаммов заключалось в биосинтезе повышенных количеств холерного токсина классического типа в результате приобретения аллеля *ctxB1* классических вибрионов [1, 2]. В настоящее время широкое распространение в мире получили Гаитянские варианты, вызвавшие в 2010 г. тяжелую эпидемию холеры на острове Гаити. При молекулярно-генетическом исследовании данных штаммов показано, что они отличаются не только от типичных изолятов, но и от других вариантов Эль Тор и имеют измененное строение суперинтегрона, острова пандемичности VSP-II, SXT элемента. Кроме того, SNPs выявлены в генах *tcpA*, *ctxB*, *rtxA*, *rstB*, кодирующих ключевые факторы колонизации и патогенеза *V. cholerae* [3–5]. Высказывается предположение, что изменения структуры генома могли быть причиной не только повышения вирулентности геновариантов Эль Тор, но и лучшего их сохранения во внешней среде [3]. Необходимо отметить, что штаммы, имеющие структуру генома, подобную Гаитянским вариантам, в 2012 и 2014 гг. завезены и в Российскую Федерацию [6].

Несмотря на активно проводимые исследования фенотипических и молекулярно-генетических свойств геновариантов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, многие вопросы их биологии изучены не в полной мере. В том числе недостаточно данных по сравнительному анализу экспрессии белков у типичных изолятов и генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор. Эти данные необходимы для получения более полной информации о циркулирующих в современный период штаммах возбудителя холеры, а также изучения вопросов доминирования и широкого распространения геновариантов. В связи с вышеизложенным целью нашей работы стало выявление различий в продукции белков у типичного штамма и генетически измененного варианта *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов и условия выращивания. В качестве модельных использованы типичный штамм *V. cholerae* M1062 O1 серогруппы биовара Эль Тор серовара Огава, выделенный в 1970 г. при вспышке холеры в Астрахани, а также геновариант из группы Гаитянских штаммов –

V. cholerae M1509 O1 серогруппы биовара Эль Тор серовара Огава, завезенный туристом в 2012 г. в Москву из Индии. Указанные клинические штаммы хранились в лиофильно высушенном состоянии в Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Культивирование штаммов осуществляли на агаре Лурия-Бертани (HiMedia, Индия) pH (7,0±0,2) в течение 16–17 ч при температуре 37 °C. Выросшую культуру центрифугировали, получая осадок клеток.

Электрофорез белков. Одномерный электрофорез образцов лизатов клеток проводили в 12,5 % полиакриламидном геле по методу W.K. Laemmli [7]. Для визуализации белков пластину геля после электрофореза окрашивали Кумасси синим G-250.

Молекулярное масс-спектрометрическое сканирование. Для выполнения масс-спектрометрического сканирования окрашенную пластину полиакриламидного геля, полученную после проведения одномерного электрофореза, нарезали на белковые полосы с различными интервалами молекулярных масс (116,0–34,0; 35,0–19,0; 20,0–14,5 кДа). Далее белки в геле гидролизовали трипсином [8]. Полученную триптическую смесь пептидов разделяли с помощью системы высокоэффективной жидкостной нано-хроматографии на хроматографической колонке AcclaimPepMap™100 75 µm x 25 cm, nanoViper C18, 3 µm, 100 Å (Thermo Fisher Scientific, USA). Масс-спектры получали на tandemном квадрупольном времяпролетном масс-спектрометре с высоким разрешением класса ESI-Q. Идентификацию белков проводили с помощью программы Mascot в режиме поиска MS/MS Ion search относительно базы данных NCBI с таксономическим ограничением для исследуемого вида микроорганизмов. В качестве вариативных модификаций выбрали карбамидометилирование цистеина, окисление метионина и ацетилирование лизина. Допустимое отклонение для масс пептидных ионов устанавливали равным 20 ppm, для фрагментарных ионов – 0,1 Да, минимальное число уникальных пептидов одного белка ≥2. Белки, имеющие критерии достоверности score >18, считались идентифицированными надежно. Белки распределяли на функциональные группы в соответствии со схемой, предложенной зарубежными исследователями (www.tigr.org).

Статистический анализ. Статистический анализ полученных экспериментальных данных осуществляли при помощи программ Microsoft Excel (стандартный пакет программ Microsoft Office 2010, США) и Statistica 6.0 (Statsoft, Россия).

Результаты и обсуждение

При молекулярном масс-спектрометрическом сканировании лизатов клеток у типичного штамма *V. cholerae* M1062 выявлено 787 белков, у штамма *V. cholerae* M1509 – 707. При этом 615 белков, необходимых для обеспечения жизнедеятельности

бактериальных клеток, поддержания структуры клеточной оболочки, репарации ДНК, обнаружены у обоих штаммов. Особый интерес вызвали оставшиеся протеины (уникальные для каждого штамма), которые и были взяты для последующего анализа. В соответствии с выполняемой в клетке функцией и согласно используемой зарубежными исследователями классификации данные белки распределили по 13 различным функциональным группам: компоненты клеточной стенки; регуляторные белки; белки с неизвестной функцией; белки патогенности; транспортные белки; белки, участвующие в биосинтезе аминокислот/белка; липидном и углеводном обменах; образовании ДНК/РНК; адаптации; клеточных процессах; белки, входящие в группы «кофакторы, витамины, пигменты» и «пурины, пиримидины, нуклеозиды».

В итоге у анализируемых штаммов практически не выявлены различия в продукции белков, необходимых для биосинтеза клеточной стенки (3,3 % у M1509 и 3,5 % у M1062) и с неустановленной функцией (7,6 % у M1509 и 8,1 % у M1062). Однако у штамма M1062, в отличие от M1509, обнаружена повышенная (на 2,6 %) экспрессия регуляторных белков, а также белков, необходимых для биосинтеза ДНК/РНК (на 6,8 %) и входящих в группу «пурины, пиримидины, нуклеозиды» (на 3,0 %). При этом регуляторные белки включали в основном регуляторы транскрипции. Отличий в биосинтезе глобальных белков-регуляторов, а также участвующих в контроле биосинтеза факторов патогенности не выявлено. Штамм *V. cholerae* M1509 синтезирует в большем количестве белки, участвующие в патогенезе (на 4,8 %); адаптации холерного вибриона при действии неблагоприятных факторов внешней среды (на 4,6 %); липидном (на 2,4 %) и углеводном (на 1,6 %) обменах; биосинтезе аминокислот и белков (на 1,3 %); белков-транспортёров аминокислот, пептидов, углеводов (на 5,1 %); относящихся к группе «кофакторы, витамины, пигменты» (на 3,5 %); обеспечивающих различные клеточные процессы: дыхание, сборка рибосом, ассимиляция азота, образование запасных веществ и т.д. (на 5,6 %). Необходимо отметить, что, несмотря на данные литературы о повышенной подвижности геновариантов Эль Тор по сравнению с типичными изолятами [5], у анализируемых нами штаммов не обнаружено отличий по продукции белков, обеспечивающих подвижность/хемотаксис клеток.

Выявление у штамма *V. cholerae* M1509 увеличенного количества белков, необходимых для проявления патогенных свойств, было вполне ожидаемым, учитывая то, что геноварианты Эль Тор вызывают клинически тяжелые случаи холеры с высокой смертностью, а также продуцируют значительно больше холерного токсина, чем типичные изоляты [1, 2, 5]. Увеличенный биосинтез белков, способствующих выживанию патогена при действии различных неблагоприятных факторов внешней среды, согласуется с ранее полученными нами, а также

зарубежными исследователями данными о повышенных адаптационных свойствах вариантов Эль Тор по сравнению с типичными изолятами [5, 9]. Значительные различия в экспрессии белков, участвующих в углеводном, липидном, белковом обменах, а также белков-транспортёров и относящихся к группе «кофакторы, витамины, пигменты» могут указывать на интенсивно протекающие метаболические процессы у данных штаммов. Возможно, увеличенная экспрессия белков, участвующих в метаболических процессах, является одной из причин выявленного нами ранее повышенного роста бактериальной популяции Эль Тор вариантов по сравнению с типичными штаммами [9].

Другим важным моментом, на который стоит обратить внимание, является обнаружение у штамма M1509 биосинтеза двух белков, входящих в систему секреции 6 типа (Т6СС). У типичного штамма Т6СС белки не выявлены. Согласно данным литературы, контакт-зависимая система секреции 6 типа используется холерным вибрионом для уничтожения бактерий, амёб, иммунных клеток макроорганизма, фагоцитов. Показано, что штаммы с повышенной экспрессией белков Т6СС лучше выживают как во внешней среде, так и в кишечнике человека. Гены, кодирующие белки Т6СС, присутствуют в геноме всех штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, но у типичных штаммов их экспрессия происходит только *in vivo* [10]. В то же время сведения о продукции данных белков у геновариантов отсутствуют. Обнаружение экспрессии *in vitro* белков Т6СС у штамма M1509 может указывать на повышенный адаптационный потенциал вариантов Эль Тор.

Необходимо также отметить выявление у анализируемых штаммов различий в содержании ферментов, участвующих в биосинтезе (дигуанилат циклаза) и деградации (дигуанилат фосфодиэстераза) 3'-5'-циклического дигуанилатмонофосфата c-di-GMP, который является важной сигнальной молекулой, контролирующей транскрипцию генов, необходимых для продукции холерного токсина, формирования биопленки, а также подвижности. K.J.F. Satchell *et al.* показали, что геноварианты, в отличие от типичных штаммов, имеют SNPs в генах *cdgM* и *cdgL*, кодирующих дигуанилат циклазу, поэтому данные штаммы синтезируют меньше c-di-GMP, чем типичные изоляты [5]. Проведенный нами анализ выявил, что действительно в типичном штамме M1062 присутствует белок с дигуанилат циклазным доменом, а у штамма *V. cholerae* M1509 обнаружена только дигуанилат фосфодиэстераза.

Таким образом, при молекулярном протеомном сканировании типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор установлено значительное сходство их протеомов, обусловленное биосинтезом белков, необходимых для обеспечения жизнедеятельности клетки, входящих в состав клеточной оболочки, участвующих в репарации ДНК, а также гипотетических белков. При этом в типичном

штамме обнаружена повышенная экспрессия регуляторных белков, а также белков, участвующих в биосинтезе ДНК/РНК и составляющих группу «пурины, пиримидины, нуклеозиды». В то же время у геноварианта увеличена экспрессия белков, ответственных за патогенез, адаптацию при действии неблагоприятных факторов внешней среды, а также участвующих в липидном, углеводном, белковом обменах, белков-транспортеров и относящихся к группе «кофакторы, витамины, пигменты». Возможно, что именно такое удачное сочетание повышения патогенных и адаптивных свойств, а также изменение метаболизма клеток явилось одной из причин доминирования и широкого распространения генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор.

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

Список литературы

1. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9):3296–9. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002.
2. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. doi: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
3. Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S., Bruce D.C., Detter J.C., Han C.S., Chertkov O., Challacombe J., Huq A., Nair G.B., Colwell R.R. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B33 and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 2010; 192:3524–33. DOI: 10.1128/JB.00040-10.
4. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11):3739–49. DOI: 10.1128/JCM.01286-11.
5. Satchell K.J., Jones C.J., Wong J., Queen J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9):2473–81. DOI: 10.1128/IAI.00189-16.
6. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кульшань Т.А., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Микроэволюция возбудителя холеры в современный период. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2014; 69(7–8):46–53. DOI: 10.15690/vramn.v69i7-8.1109.
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
8. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. 2006; 1(6):2856–60. DOI: 10.1038/nprot.2006.468.
9. Заднова С.П., Крицкий А.А., Плеханов Н.А., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ адаптационных свойств типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2019; 2:25–30. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-2-25-30.

10. Conner J.G., Teschler J.K., Jones C.J., Yildiz F.H. Staying alive: *Vibrio cholerae*'s cycle of environmental survival, transmission, and dissemination. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(2):VMBF-0015-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015.

References

1. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9):3296–9. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002.
2. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. doi: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
3. Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S., Bruce D.C., Detter J.C., Han C.S., Chertkov O., Challacombe J., Huq A., Nair G.B., Colwell R.R. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B33 and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 2010; 192:3524–33. DOI: 10.1128/JB.00040-10.
4. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11):3739–49. DOI: 10.1128/JCM.01286-11.
5. Satchell K.J., Jones C.J., Wong J., Queen J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9):2473–81. DOI: 10.1128/IAI.00189-16.
6. Smirnova N.I., Agafonov D.A., Kul'shan' T.A., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V. Microevolution of cholera agent in the modern period. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk [Bulletin of the RAMS]*. 2014; 69(7–8):46–53. DOI: 10.15690/vramn.v69i7-8.1109.
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
8. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. 2006; 1(6):2856–60. DOI: 10.1038/nprot.2006.468.
9. Zаднова S.P., Kritsky A.A., Plekhanov N.A., Cheldyshova N.B., Smirnova N.I. Comparative analysis of adaptation properties in typical and genetically altered *Vibrio cholerae* El Tor strains. *Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology [Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii]*. 2019; 2:25–30. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-2-25-30.
10. Conner J.G., Teschler J.K., Jones C.J., Yildiz F.H. Staying alive: *Vibrio cholerae*'s cycle of environmental survival, transmission, and dissemination. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(2):VMBF-0015-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015.

Authors:

Zаднова S.P., Badanin D.V., Plekhanov N.A., Polunina T.A., Kotova N.V., Kritsky A.A., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Заднова С.П., Баданин Д.В., Плеханов Н.А., Полунина Т.А., Котова Н.В., Крицкий А.А., Федоров А.В., Краснов Я.М. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-154-157

УДК 616.98:578.2

Р.В. Попова^{1,2}, Т.А. Руженцова¹, Д.А. Хавкина¹, П.В. Чухляев¹, А.А. Гарбузов¹, Н.А. Мешкова³**НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ПРИ COVID-19 У ДЕТЕЙ**¹ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», Москва, Российская Федерация;²ГБУЗ МО «Мытищинская городская клиническая больница», Мытищи, Российская Федерация;³ГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Москва, Российская Федерация

Цель исследования – изучить особенности нарушений функции желудочно-кишечного тракта у детей, больных коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2. **Материалы и методы.** Проанализирована частота, сроки появления, продолжительность и характер желудочно-кишечных нарушений по данным историй болезней 36 детей, находившихся на лечении с диагнозом «внебольничная пневмония коронавирусной этиологии (вирус SARS-CoV-2 идентифицирован)» в детском инфекционном отделении ГБУЗ МО «МГКБ» г. Мытищи. **Результаты и обсуждение.** Желудочно-кишечные нарушения у 23 детей (64 %) проявлялись на 4–5-й день, у 8 (22 %) – до начала терапии, продолжались от 3 до 5 дней. У большинства детей отмечали диарею (64 %) и боли в животе (57 %). Другие симптомы, свидетельствующие о дисфункции желудочно-кишечного тракта, зарегистрированы у 67 % детей. Желудочно-кишечные нарушения имеются у большинства детей, госпитализированных с внебольничной пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Симптоматика купируется при проведении курса основной терапии, показанной для лечения COVID-19, и дополнительной, рекомендуемой при острых кишечных инфекциях.

Ключевые слова: абдоминальная боль, дети, диарея, коронавирус, пневмония, COVID-19, SARS-CoV-2.

Корреспондирующий автор: Руженцова Татьяна Александровна, e-mail: ruzhencova@gmail.com.

Для цитирования: Попова Р.В., Руженцова Т.А., Хавкина Д.А., Чухляев П.В., Гарбузов А.А., Мешкова Н.А. Нарушения функции желудочно-кишечного тракта при COVID-19 у детей. Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 3:154–157. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-154-157

Поступила 17.09.20. Принята к публ. 22.09.20.

R.V. Popova^{1,2}, T.A. Ruzhentsova¹, D.A. Khavkina¹, P.V. Chukhlyayev¹, A.A. Garbuzov¹, N.A. Meshkova³**Gastrointestinal Tract Disorders in COVID-19 Infected Children**¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation; ²Mytishchi State Clinical Hospital, Mytishchi, Russian Federation;³First Moscow State Medical University n.a. I.M. Sechenov, Moscow, Russian Federation

Abstract. Objective of the work was to investigate the peculiarities of gastrointestinal tract disorders in children with coronavirus disease caused by SARS-CoV-2 virus. **Materials and methods.** We have analyzed the frequency, terms of emergence, duration and character of gastrointestinal disorders on the basis of medical records of 36 children receiving the treatment for community-acquired pneumonia of coronavirus etiology (positive for SARS-CoV-2 virus) in the children's infectious disease department of Moscow State Clinical Hospital, Mytishchi. The majority of patients had moderate form of the disease (97 %), severe cases were not registered. The age range of the children – 8 months to 17 years old. All patients were subjected to supplementary examination on Day 1 in accordance with the current recommendations. Children were treated in hospital settings for 8–15 days. Assessment of clinical status was performed at least once a day over the stated period, supplementary survey – at least once in a week, upon indications – more frequently. SARS-CoV-2 virus was identified using polymerase chain reaction. All patients received standard therapy in compliance with advanced methodological recommendations, upon indications – other pharmaceutical products. **Results and discussion.** Gastro-intestinal disorders in 23 children (64 %) emerged on Day 4–5, in 8 children (22 %) – before the start of the treatment; they lasted 3–5 days. In most of the patients diarrhea (64 %) and stomachaches (57 %) were observed. 67 % of the children demonstrated other symptoms indicative of gastrointestinal dysfunction. The disorders were characteristic for most of the children hospitalized with community-acquired pneumonia caused by SARS-CoV-2 virus. The symptoms are contained when the main course of therapy is conducted, indicated for treatment of COVID-19, and additional therapy recommended for management of gastro-intestinal infections is performed.

Key words: abdominal pain, children, diarrhea, coronavirus, pneumonia, COVID-19, SARS-CoV-2.

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

Corresponding author: Tatiana A. Ruzhentsova, e-mail: ruzhencova@gmail.com.

Citation: Popova R.V., Ruzhentsova T.A., Khavkina D.A., Chukhlyayev P.V., Garbuzov A.A., Meshkova N.A. Gastrointestinal Tract Disorders in COVID-19 Infected Children. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:154–157. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-154-157
Received 17.09.20. Accepted 22.09.20.

Ruzhentsova T.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6945-2019>

Khavkina D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5919-9841>

Chukhlyayev P.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1210-1215>

Garbuzov A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3378-8418>

Нарушения функции желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) нередко сопровождают острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ). Наиболее часто сочетание симптоматики регистрируется при ротавирусной инфекции, реже – при норовирусной, аденовирусной инфекции, бока- и метапневмовирусной инфекции, гриппе. Механизм формирования желудочно-кишечных проявлений может быть различным. Возможно как непосредственное действие возбудителя на клетки ЖКТ с их прямым поражением и последующим апоптозом, так и косвенное – через нарушения кровотока или нервной регуляции. Вирус SARS-CoV-2 взаимодействует преимущественно с рецепторами ангиотензин-превращающего фермента 2 типа (АПФ-2), которые присутствуют в разных тканях, в том числе на клетках эпителия ЖКТ и на эндотелии кровеносных сосудов [1–3]. Почти с самого начала изучения новой коронавирусной инфекции стало понятно, что, наряду с симптомами поражения дыхательных путей и интоксикацией, у пациентов нередко отмечаются желудочно-кишечные нарушения. В некоторых случаях сложно определить, связана ли симптоматика с инфекционным агентом или же с проводимой терапией. Однако, вне зависимости от причины, диарея и рвота могут приводить к обезвоживанию с развитием гиповолемического шока, электролитному дисбалансу и метаболическим нарушениям.

Цель исследования – изучить особенности нарушений функции желудочно-кишечного тракта у детей, больных коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Проанализированы частота, сроки появления, продолжительность и характер желудочно-кишечных нарушений по данным историй болезней 36 детей, находившихся на лечении с диагнозом «внебольничная пневмония коронавирусной этиологии (вирус SARS-CoV-2 идентифицирован)» в детском инфекционном отделении ГБУЗ МО «МГКБ» г. Мытищи с марта по июль 2020 г. Большинство пациентов имели среднетяжелую форму заболевания (97 %), тяжелых форм не зарегистрировано. Возраст детей – от 8 месяцев до 17 лет. Большинство пациентов находились в возрасте от 8 месяцев до 3 лет (13 детей – 36 %), 3–6 лет – 22 % (8 детей), 6–10 лет – 14 % (5 детей), 10–17 лет – 28 % (10 детей). Длительность наблюдения и лечения на дому до момента госпитализации составляла от трех до восьми дней. Всем детям в 1-й день госпитализации проведены клинический осмотр, рентгенография или компьютерная томография (КТ) легких, анализы крови – клинический и биохимический, коагулограмма, общий анализ мочи, анализ мазка из зева и носа на вирус SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). При наличии диареи проводили бактериологическое исследование кала для идентификации возбудителей кишечной группы

(сальмонелл, шигелл, эшерихий, кампилобактера) и иммуноферментный анализ для исключения ротавирусной или норовирусной инфекции. При выявлении каких-либо других возбудителей, помимо SARS-CoV-2, пациенты исключались из данного наблюдения.

В стационаре дети находились в течение 8–15 дней до выздоровления или устойчивого улучшения с наличием не менее двух отрицательных результатов анализа мазка из зева и носа на наличие вируса SARS-CoV-2. За этот период оценка клинического статуса проводилась не реже 1 раза в день, дополнительное обследование – не реже 1 раза в 7 дней, по показаниям – чаще.

Пациенты получали терапию в соответствии с временными методическими рекомендациями по ведению больных с COVID-19. При желудочно-кишечных нарушениях назначали дополнительно, в соответствии с имеющимися стандартами, средства для регидратации, энтеросорбенты и пробиотики, а также диету с исключением сырых фруктов и овощей, молочных продуктов и продуктов, стимулирующих газообразование. Всем детям в связи с подтвержденной, по данным рентгенографии или КТ легких, пневмонией назначена антибактериальная терапия согласно принятым в стационаре подходам: внутримышечно антибиотик из группы цефалоспоринов (Цефтриаксон – 35 детям, 97 %); одному ребенку, у которого выявлены минимальные клинические и рентгенологические изменения, назначен перорально антибиотик из группы макролидов (азитромицин). В качестве сопутствующих препаратов для профилактики или лечения дисбиотических нарушений пациентам назначали пробиотики из числа имеющихся в стационаре: Бифидумбактерин (32 детям, 89 %), Баксет (4 детям, 11 %). В качестве противовирусной терапии применяли интерферон альфа-2b (Гриппферон назально – 31 ребенку, 86 %) или интерферон в сочетании с иммуноглобулином (Кипферон – 5 детям, 14 %). По диагнозу «пневмония» дети получали муколитики (35 детей, 97 %), кортикостероидную терапию (Дексаметазон внутримышечно в 36 % случаев), бронхолитики (Беродуал – в 64 %). В качестве местной элиминирующей терапии назначали местные антисептики (Мирамистин – в 86 %). При наличии аллергии в анамнезе или выявлении уртикарной сыпи применяли антигистаминные препараты (9 детей, 25 %). При диарейном синдроме назначали стандартную оральную (50 %) или параэнтеральную (14 %) регидратационную терапию, энтеросорбенты (диоктаэдрический смектит, Смекту или диоксид кремния коллоидный, Полисорб). При гемоколите в схему лечения добавляли антигеморрагические средства (Викасол внутримышечно – в 14 %). При симптомах ферментативной недостаточности после купирования острой диареи назначали ферменты (Креон или Панкреатин – в 67 %). Парацетамол в качестве жаропонижающего средства дети получали при температуре более 38 °С, в соответствии с временными рекомендациями.

От родителей детей, а также подростков в возрасте от 14 до 18 лет получено информированное согласие на использование в научных целях и публикациях обезличенных данных из историй болезней.

Результаты и обсуждение

Основными симптомами у всех детей при поступлении была интоксикация со снижением аппетита, слабостью, сонливостью, утомляемостью, редкий сухой кашель. Температура тела выше нормы у 97 % пациентов, при этом максимальное значение составило 38,2 °C.

При анализе анамнеза и клинической картины в динамике установлено, что диарея отмечалась с 4–5-х суток заболевания у 23 детей (64 %) и продолжалась от трех до пяти дней. Стул был жидким, слизистым, в единичных случаях (в 14 % от общего числа детей) – с прожилками крови. Частота стула у большинства детей была до 5 раз в сутки, максимум – до 8 раз.

Выраженность и продолжительность болей в животе оценивали только в группе детей старше 3 лет. Среди этих пациентов абдоминальный болевой синдром выражен у 13 детей (57 %), в большинстве случаев по срокам появления и продолжительности соответствовал диарейному синдрому. Интенсивность боли – от незначительной до очень выраженной, требующей проведения дифференциальной диагностики с острым аппендицитом. Рвоты не отмечено ни в одном случае. Тошнота отмечалась у детей, жаловавшихся на боли в животе.

У большинства пациентов появление желудочно-кишечных симптомов отмечали на фоне проводимой терапии. Однако у 8 детей (22 %) диарея впервые зарегистрирована до начала лечения, в числе одного из первых симптомов COVID-19.

Положительный ответ на терапию был достаточно быстрый, коррекции схемы в большинстве случаев не требовалось. Однако, в отличие от изученных нами ранее инфекционных диарей, продолжительность диареи при COVID-19 была дольше, меньше выражен результат в ответ на начало лечения [4]. После купирования диареи нередко сохранялись плохой аппетит, тошнота, дискомфорт после еды, метеоризм, что становилось поводом для назначения препаратов на основе ферментов. К моменту выписки из стационара у всех пациентов симптомы нарушений функции желудочно-кишечного тракта купированы.

Таким образом, диарея и абдоминальные боли наблюдаются у большинства детей, госпитализированных с пневмонией, вызванной SARS-CoV-2. Частота выявленных нами желудочно-кишечных проявлений при COVID-19 существенно выше представленной в публикациях других исследователей [5]. Это может быть связано как с особенностями циркулирующего варианта вируса, так и с преобладающим возрастом наблюдавшихся пациентов.

В большинстве случаев изменения характера и частоты стула внимательно отслеживаются родителями детей раннего и дошкольного возраста, тогда как взрослые пациенты, имеющие симптомы респираторной инфекции, не всегда считают необходимым сообщить врачу об имеющихся отклонениях, оценивая их как закономерные в ответ на изменения в питании или прием препаратов.

Выраженный болевой синдром, отмеченный у некоторых пациентов, существенно отличает течение COVID-19 от других респираторных инфекций. У этих пациентов, вероятно, боли связаны с развитием мезаденита или преходящих нарушений кровоснабжения органов ЖКТ, что требует проведения дальнейших исследований.

Купирование симптоматики без исключения противовирусной и антибактериальной терапии указывает на непосредственное участие коронавируса в патогенезе желудочно-кишечных нарушений и может опровергать возможное влияние дисбиотических нарушений с активизацией роста условно-патогенной флоры, а также дисфункции гепато-билиарной системы, что нельзя исключить при применении, в первую очередь, цефалоспоринов. Высокая частота регистрации желудочно-кишечных нарушений, у многих детей до начала терапии, подтверждает тропность нового коронавируса к органам ЖКТ. Большое число случаев дискомфорта в животе после еды, тошноты, метеоризма свидетельствует о, вероятно, развивающейся ферментопатии и возможном вовлечении в инфекционно-воспалительный процесс поджелудочной железы и гепато-билиарной системы, что также требует дальнейшего изучения.

Таким образом, желудочно-кишечные нарушения имеются у большинства детей, госпитализированных с внебольничной пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Диарея выявлена в 64 %, абдоминальный болевой синдром – у 57 %, другие симптомы, свидетельствующие о дисфункции желудочно-кишечного тракта, – в 67 %. Симптоматика купируется при проведении курса основной терапии, показанной для лечения COVID-19, и дополнительной, рекомендуемой при острых кишечных инфекциях.

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

Список литературы

1. Tang X., Wu C., Li X., Yu-He Song, Xinmin Yao, Xinkai Wu, Yuange Duan, Zhang H., Yirong Wang, Zhaohui Qian, Jie Cui, Lu J. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *National Science Review*. 2020; 7(6):1012–23. DOI: 10.1093/nsr/nwaa036.
2. World Health Organization. Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020> (дата обращения 12.02.2020).
3. Хавкина Д.А., Руженцова Т.А., Чухляев П.В., Гарбузов А.А., Шушакова Е.К. Роль дезинтоксикационной и антиоксидантной терапии в лечении COVID-19: теория и практика. *Эпидемиология и инфекционные болезни: актуальные вопросы*. 2020; 2:62–9. DOI: 10.18565/epidem.2020.2.62-69.
4. Руженцова Т.А., Плоскирева А.А., Попова Р.В., Нурибеков С.А., Горелов А.В. Оптимизация патогенетической терапии

острых кишечных инфекций у детей: результаты рандомизированного исследования. *Инфекционные болезни*. 2018; 2(16):70–6.

5. Wei-jie Guan, Zheng-Yi Ni, Yu Hu, Wen-Hua Liang, Chun-Quan Ou, Jian-Xing He, Lei Liu, Hong Shan, Chun-Liang Lei, David S C Hui, Bin Du, Lan-Juan Li, Guang Zeng, Kwok-Yung Yuen, Ru-Chong Chen, Chun-Li Tang, Tao Wang, Ping-Yan Chen, Jie Xiang, Shi-Yue Li, Jin-Lin Wang, Zi-Jing Liang, Yi-Xiang Peng, Li Wei, Yong Liu, Ya-Hua Hu, Peng Peng, Jian-Ming Wang, Ji-Yang Liu, Zhong Chen, Gang Li, Zhi-Jian Zheng, Shao-Qin Qiu, Jie Luo, Chang-Jiang Ye, Shao-Yong Zhu, Nan-Shan Zhong. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382:1708–20. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.

References

1. Tang X., Wu C., Li X., Yu-He Song, Xinmin Yao, Xinkai Wu, Yuange Duan, Zhang H., Yirong Wang, Zhaohui Qian, Jie Cui, Lu J. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *National Science Review*. 2020; 7(6):1012–23. DOI: 10.1093/nsr/nwaa036.

2. World Health Organization. Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. (Cited 12 Feb 2020). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>.

3. Khavkina D.A., Ruzhentsova T.A., Chukhlyaev P.V., Garbuzov A.A., Shushakova E. K. [Role of disintoxication and antioxidant therapy for COVID-19: theory and practice]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]*. 2020; 2:62–9. DOI: 10.18565/epidem.2020.2.62-69.

4. Ruzhentsova T.A., Ploskireva A.A., Popova R.V., Nuribekov S.A., Gorelov A.V. [Optimisation of pathogenetic therapy of acute intestinal infections in children: results of a randomised trial]. *Infektsionnye Bolezni. [Infectious Diseases]*. 2018; 2(16):70–6.

5. Wei-jie Guan, Zheng-Yi Ni, Yu Hu, Wen-Hua Liang, Chun-

Quan Ou, Jian-Xing He, Lei Liu, Hong Shan, Chun-Liang Lei, David S C Hui, Bin Du, Lan-Juan Li, Guang Zeng, Kwok-Yung Yuen, Ru-Chong Chen, Chun-Li Tang, Tao Wang, Ping-Yan Chen, Jie Xiang, Shi-Yue Li, Jin-Lin Wang, Zi-Jing Liang, Yi-Xiang Peng, Li Wei, Yong Liu, Ya-Hua Hu, Peng Peng, Jian-Ming Wang, Ji-Yang Liu, Zhong Chen, Gang Li, Zhi-Jian Zheng, Shao-Qin Qiu, Jie Luo, Chang-Jiang Ye, Shao-Yong Zhu, Nan-Shan Zhong. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382:1708–20. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.

Authors:

Popova R.V. Central Research Institute of Epidemiology; 3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russian Federation; e-mail: crie@pcr.ru. Mytishchi State Clinical Hospital, Mytishchi, Russian Federation.

Ruzhentsova T.A., Khavkina D.A., Chukhlyaev P.V., Garbuzov A.A. Central Research Institute of Epidemiology. 3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russian Federation. E-mail: crie@pcr.ru.

Meshkova N.A. First Moscow State Medical University n.a. I.M. Sechenov. 2, building 4, Bolshaya Pirogovskaya St., Moscow, 119435, Russian Federation.

Об авторах:

Попова Р.В. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии; Российская Федерация, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а; e-mail: crie@pcr.ru. Мытищинская городская клиническая больница; Российская Федерация, Мытищи.

Руженцова Т.А., Хавкина Д.А., Чухляев П.В., Гарбузов А.А., Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. Российская Федерация, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а. E-mail: crie@pcr.ru.

Мешкова Н.А. Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова. Российская Федерация, 119435, Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4

К 65-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АЛЕКСАНДРА НИКОЛАЕВИЧА КУЛИЧЕНКО

23 сентября 2020 г. исполнилось 65 лет Александру Николаевичу Куличенко – директору ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, члену-корреспонденту РАН, доктору медицинских наук, профессору, лауреату Государственной премии Российской Федерации.

С его именем связано развитие в институте таких инновационных направлений, как применение постгеномных технологий при изучении возбудителей опасных инфекционных болезней, внедрение молекулярного анализа в эпидемиологии.

А.Н. Куличенко были разработаны первые ПЦР тест-системы для детекции ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и бруцеллеза, впервые на моделях возбудителей особо опасных инфекционных болезней применены принципы многофакторного генодиагностического анализа. Под руководством А.Н. Куличенко впервые проведены исследования по генетическому профилированию региональных (территориальных) вариантов возбудителей природно-очаговых и особо опасных инфекций регионов ЮФО, СКФО.

За заслуги в области разработки новых методов диагностики и профилактики сибирской язвы Александр Николаевич, в составе авторского коллектива, был удостоен Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники (2003 г.).

А.Н. Куличенко сформирована научная школа по молекулярному анализу возбудителей особо опасных инфекций, при его научном руководстве и консуль-



тировании защищены 3 диссертации на соискание ученой степени доктора наук и 17 – ученой степени кандидата наук.

А.Н. Куличенко – автор 11 монографий, более 700 опубликованных научных работ, 53 патентов Российской Федерации на изобретение.

Александр Николаевич – член Президиума Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, заместитель председателя Координационного научного совета по санитарно-эпиде-

миологической охране территории Российской Федерации, член диссертационного совета при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, член редакционного совета журнала «Проблемы особо опасных инфекций», член редакционной коллегии журнала «Медицинский вестник Северного Кавказа».

А.Н. Куличенко награжден медалями ордена «За заслуги перед Отечеством» I и II степени, нагрудными знаками «Почетный работник Роспотребнадзора» и «Отличник санэпидслужбы России», ведомственными грамотами и наградами, а также медалями Ставропольского края «За доблестный труд» (II и III степени).

Юбилейную дату Александр Николаевич встречает в расцвете сил, полный творческих планов.

Редакционный совет и редакционная коллегия журнала «Проблемы особо опасных инфекций» сердечно поздравляют Александра Николаевича с юбилеем и желают ему здоровья, благополучия и новых успехов на благо российского здравоохранения и медицинской науки.