

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

КООРДИНАЦИОННЫЙ НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОХРАНЕ ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ «МИКРОБ»

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

2021

САРАТОВ

**Подписной индекс в каталоге
«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, И.А. Дубчак
Технический редактор *Т.К. Меркулова*
Перевод на английский
А.П. Ножкиной, Т.Б. Караваевой

Проблемы особо опасных инфекций.
2021. Вып. 3. 148 с.

Подписано в печать 26.09.2021.
Формат 60×84 1/8
Бумага мелованная
Печать офсетная
Усл. печ. л. 18,13.
Гарнитура Таймс. Заказ 4094-21/18101.

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

© Федеральное казенное учреждение
здравоохранения «Российский научно-
исследовательский противочумный
институт «Микроб», 2021

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)
Сергеев 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,
иностранный 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

2021, 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: *Kutyr 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)
Guly 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)
Mikerov 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	
Останкова Ю.В., Найденова Е.В., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Хуйнх Хоанг Khanh Txy, Семенов А.В. К вопросу о коинфицировании вирусами денге и возбудителями гемоконтактных инфекций в Социалистической Республике Вьетнам	6
Стовба Л.Ф., Мельников С.А., Павельев Д.И., Кротков В.Т., Черникова Н.К., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Анализ результатов клинических испытаний рекомбинантного вируса вакцины, штамм MVA, экспрессирующего гены вируса иммунодефицита человека.....	13
Тимофеев В.С., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Goncharova Ю.О., Дятлов И.А. Пути распространения сибирской язвы в природных экосистемах.....	23
Трегубчак Т.В., Бауэр Т.В., Максютов Р.А., Гаврилова Е.В. Случаи заражения ортопоксвирусными инфекциями в мире за период 2008–2018 гг.....	33
Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Кузнецова И.В., Бобрышева О.В., Красовская Т.Л., Куличенко А.Н. Программные решения для индикации и идентификации патогенных микроорганизмов методом времяпролетной массспектрометрии.....	40
Оригинальные статьи	
Дугаржапова З.Ф., Ивачева М.А., Чеснокова М.В., Кравец Е.В., Решетняк Е.А., Кузин Д.Ю., Уманец А.А., Детковская Т.Н., Балахонов С.В. Сибирская язва в Приморском крае (1919–2020 гг). Сообщение 1. Исторические сведения и характеристика стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов.....	51
Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Катунина Л.С., Василенко Е.И. Оценка использования генцианвиолета и малахитового зеленого в качестве селективных агентов при выделении бруцелл	60
Коломоц Е.В., Ицков Я.Ю., Найденова Е.В., Kopomou V., Keita S., Lamah R. Создание и обеспечение функционирования госпитальной сети для лечения больных COVID-19 в Гвинейской Республике	66
Крицкий А.А., Смирнова Н.И., Каляева Т.Б., Оброткина Н.Ф., Грачева И.В., Катышев А.Д., Кутырев В.В. Сравнительный анализ молекулярно-генетических свойств нетоксигенных штаммов <i>Vibrio cholerae</i> O1 биовара Эль Тор, изолированных в России и на эндемичных по холере территориях	72
Куклина Г.В., Ипатов С.С., Печенин Д.В., Еремкин А.В., Кытманов А.А., Дубровин М.Ю., Горшков А.С. Получение и характеристика гибридом-продуцентов monoclonalных антител к шигаподобным токсинам I и II типов..	83
Миронова Л.В., Пономарева А.С., Басов Е.А., Федотова И.С., Хунхеева Ж.Ю., Фортунатова А.В., Бочалгин Н.О., Гладких А.С., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В. Оценка эффективности детекции генетических детерминант <i>Vibrio cholerae</i> в системе мониторинга вибриофлоры водных объектов.....	89

Reviews

Ostankova Yu.V., Naidenova E.V., Serikova E.N., Schemelev A.N., Valutite D.E., Zueva E.B., Huinh Hoang Khanh Thu, Semenov A.V. Regarding Coinfection with Dengue Viruses and Agents of Hemocontact Infections in the Socialist Republic of Vietnam

Stovba L.F., Mel'nikov S.A., Pavel'ev D.I., Krotkov V.T., Chernikova N.K., Lebedev V.N., Borisevich S.V. The Results of Clinical Trials of Recombinant Vaccine Virus, MVA Strain, Expressing Genes of Human Immunodeficiency Virus

Timofeev V.S., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Goncharova Yu.O., Dyatlov I.A. Routes of Spread of Anthrax in Natural Ecosystems

Tregubchak T.V., Bauer T.V., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Cases of Orthopoxviral Infections around the World over a Period of 2008–2018

Ulshina D.V., Kovalev D.A., Kuznetsova I.V., Bobrysheva O.V., Krasovskaya T.L., Kulichenko A.N. Software Solutions for Indication and Identification of Pathogenic Microorganisms by the Method of Time-of-Flight Mass Spectrometry

Original articles

Dugarzhapova Z.F., Ivacheva M.A., Cheskova M.V., Kravets E.V., Reshetnyak E.A., Kuzin D.Yu., Umanets A.A., Detkovskaya T.N., Balakhonov S.V. Antrax in Primorsky Territory (1919–2020). Communication 1. Historical Records and Characteristics of Stationary Potentially Hazardous as Regards Antrax Areas

Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. Assessment of the Use of Gentian Violet and Malachite Green as Selective Agents in the Isolation of Brucella

Kolomoets E.V., Itskov Ya.Yu., Naidenova E.V., Konomou V., Keita S., Lamah R. Creation and Support of Operation of a Hospital Net to Treat COVID-19 Patients in Guinea

Kritsky A.A., Smirnova N.I., Kalyaeva T.B., Obrotkina N.F., Gracheva I.V., Katyshev A.D., Kutyrev V.V. Comparative Analysis of Molecular-Genetic Properties of Non-Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Strains Biovar El Tor, Isolated in Russia and on Cholera Endemic Territories

Kuklina G.V., Ipatov S.S., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kytmanov A.A., Dubrovin M.Y., Gorshkov A.S. Obtaining and Characterization of Hybridomas Producing Monoclonal Antibodies to Shiga-Like Toxins of I and II Types

Mironova L.V., Ponomareva A.S., Basov E.A., Fedotova I.S., Khunkheeva Zh.Yu., Fortunatova A.V., Bochalgin N.O., Gladkikh A.S., Urbanovich L.Ya., Balakhonov S.V. Assessing the Efficiency of Detection of *Vibrio cholerae* Genetic Determinants Through Waterbody Vibrioflora Monitoring System

Никитин А.Я., Чеснокова М.В., Балахонов С.В. Алгоритм и результаты краткосрочного прогноза изменения коэффициента распространения COVID-19 в субъектах Российской Федерации..... Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Филатов П.В., Ушканенко Н.Д., Якубецкий С.Н., Сергеев Ал.А., Щербаков Д.Н. Ускоренный способ выявления ортопоксвирусов..... Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Дёмина Ю.В., Мельникова А.А., Курганова О.П., Фомкина Н.Н., Юрдина О.М., Бурдинская Е.Н., Троценко О.Е., Тотолян А.А., Корита Т.В., Базыкина Е.А., Котова В.О., Конов Д.В., Карисалов М.Ю. Эффективность противоэпидемических мер, обеспечивающих порядок допуска к работе вахтовым методом на фоне пандемии COVID-19	98	Nikitin A.Ya., Chesnokova M.V., Balakhonov S.V. Algorithm and Results of Short-Term Forecast of Changes in the COVID-19 Spread Coefficient in the Constituent Entities of the Russian Federation Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Filatov P.V., Ushkalenko N.D., Yakubetsky S.N., Sergeev Al. A., Shcherbakov D.N. Rapid Detection of Orthopoxviruses Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Melnikova A.A., Kurganova O.P., Fomkina N.N., Yurdina O.M., Burdinskaya E.N., Trotsenko O.E., Totolyan A.A., Korita T.V., Bazikina E.A., Kotova V.O., Konov D.V., Karisalov M.Yu. Efficiency of Anti-Epidemic Measures That Ensure Access to Work in Rotational Shifts under Conditions of COVID-19 Pandemic
Попова А.Ю., Руженцова Т.А., Хавкина Д.А., Туйчиев Л.Н., Ахмедова М.Д., Мадазимов М.М., Холматова К.Ш., Кедрова О.В., Смелянский В.П., Скрябина С.В., Ахмедов У.Б., Шарова И.Н., Эралиев У.Э., Абдухалилова Г.К., Чухляев П.В., Гарбузов А.А., Акимкин В.Г., Акбаров Т.Ю., Рахматуллаева Ш.Б., Жанибеков Ж.Ж. Опыт международного сотрудничества по организации учреждениями здравоохранения противоэпидемических мероприятий в условиях пандемии COVID-19 в Республике Узбекистан	114	Popova A.Yu., Ruzhentsova T.A., Khavkina D.A., Tuychiev L.N., Akhmedova M.D., Madazimov M.M., Kholmatova K.Sh., Kedrova O.V., Smelyansky V.P., Scryabina S.V., Akhmedov U.B., Sharova I.N., Eraliev U.E., Abdulkhalilova G.K., Chukhlyayev P.V., Garbuзов A.A., Akimkin V.G., Akbarov T.Yu., Rakhmatullaeva Sh.B., Zhanibekov Zh.Zh. Experience in International Cooperation on Organization of Anti-Epidemic Measures by Health Care Institutions under COVID-19 Pandemic in the Republic of Uzbekistan
Тупота Н.Л., Терновой В.А., Карташов М.Ю., Пономарева Е.П., Локтев В.Б. Детекция <i>Borrelia miyamotoi</i> в иксодовых клещах, собранных на юге Западной Сибири ... Цимбалистова М.В., Сорокин В.М., Аронова Н.В., Анисимова А.С., Пичурина Н.Л., Пасюкова Н.И., Селянская Н.А., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Павлович Н.В., Ковалев Е.В., Носков А.К. Биологические свойства и генетическая характеристика штаммов <i>Francisella tularensis</i> , изолированных на территории Ростовской области в 2020 г	122	Tupota N.L., Ternovoi V.A., Kartashov M.Y., Ponomareva E.P., Loktev V.B. Detection of <i>Borrelia miyamotoi</i> in Ixodidae Ticks Collected in the South of Western Siberia Tsimbalistova M.V., Sorokin V.M., Aronova N.V., Anisimova A.S., Pichurina N.L., Pas'yukova N.I., Selyanskaya N.A., Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Pavlovich N.V., Kovalev E.V., Noskov A.K. Biological Properties and Genetic Characteristics of <i>Francisella tularensis</i> Strains Isolated in the Territory of the Rostov Region in 2020
Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Зеликман С.Ю. Анализ заболеваемости лихорадкой Ку в Российской Федерации в период с 1957 по 2019 год	141	Shpyunov S.N., Rudakov N.V., Zelikman S.Yu. Analysis of Q Fever Incidence in the Russian Federation between 1957 and 2019
Юбилеи		
К юбилею Людмилы Павловны Алексеевой..... К юбилею Эльзы Афанасьевны Москвитиной	147	To the Anniversary of Lyudmila P. Alekseeva To the Anniversary of El'za A. Moskvitina
Памяти коллеги		
Памяти Нины Пантелеимоновны Буравцевой (1933–2021 гг.)	148	Of blessed memory of Nina P. Buravceva (1933–2021)
Anniversaries		
Revering the Memory or the Colleague		

**Ю.В. Останкова¹, Е.В. Найденова², Е.Н. Серикова¹, А.Н. Щемелев¹, Д.Э. Валутите¹, Е.Б. Зуева¹,
Хуйнх Хоанг Khanh Thu³, А.В. Семенов⁴**

К ВОПРОСУ О КОИНФИЦИРОВАНИИ ВИРУСАМИ ДЕНГЕ И ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ГЕМОКОНТАКТНЫХ ИНФЕКЦИЙ В СОЦИАЛИСТИЧЕСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ ВЬЕТНАМ

¹ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ² ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ³ Институт имени Пастера, Хошимин, Социалистическая Республика Вьетнам; ⁴Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВВ «Вектор», Екатеринбург, Российской Федерации

По данным Всемирной организации здравоохранения, во всем мире наблюдается увеличение числа случаев заболевания лихорадкой денге. Во многих странах, где лихорадка денге является эндемичным заболеванием, широко распространены гемоконтактные инфекции, ассоциированные с вирусами гепатитов В и С, ВИЧ. Социалистическая Республика Вьетнам является эндемичным регионом для всех указанных патогенов. Уникальная эпидемиологическая обстановка, складывающаяся в стране, дает возможность изучения взаимодействия между арбовирусами, возбудителями парентеральных вирусных гепатитов, и ВИЧ-инфекций в организме больных людей. Целью настоящего обзора является анализ литературных данных о выявлении случаев сочетанного инфицирования вирусами денге 1–4-го типов и возбудителями гемоконтактных инфекций у больных людей в Социалистической Республике Вьетнам. Несмотря на то, что коинфекция вирусами денге с ВИЧ, вирусами гепатита С или В может влиять на патофизиологические механизмы развития болезни, работ, посвященных этой проблеме, оказалось крайне мало, в том числе в близлежащих с Вьетнамом регионах. Поэтому исследования в данном направлении перспективны как для фундаментальной науки, так и для практической медицины.

Ключевые слова: вирусы денге 1–4-го типа, вирус иммунодефицита человека, вирус гепатита В, вирус гепатита С, коинфекция, Социалистическая Республика Вьетнам.

Корреспондирующий автор: Останкова Юлия Владимировна, e-mail: shenna1@yandex.ru.

Для цитирования: Останкова Ю.В., Найденова Е.В., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Хуйнх Хоанг Khanh Thu, Семенов А.В. К вопросу о коинфекции вирусами денге и возбудителями гемоконтактных инфекций в Социалистической Республике Вьетнам. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 3:6–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-6-12.

Поступила 13.08.2021. Отправлена на доработку 19.08.2021. Принята к публ. 21.09.2021.

**Yu.V. Ostankova¹, E.V. Naidenova², E.N. Serikova¹, A.N. Schemellev¹, D.E. Valutite¹, E.B. Zueva¹,
Huinh Hoang Khanh Thu³, A.V. Semenov⁴**

Regarding Coinfection With Denge Viruses and Agents of Hemocontact Infections in the Socialist Republic of Vietnam

¹Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russia;

²Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

³Pasteur Institute, Ho Chi Minh City, Socialist Republic of Vietnam

⁴Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. According to the WHO, there is an increase in the number of cases of dengue fever worldwide. In many countries, where dengue fever is an endemic disease, blood-borne infections associated with hepatitis B and C viruses and HIV are widespread. The Socialist Republic of Vietnam is an endemic region for these pathogens. The unique epidemiological situation in the country provides an excellent opportunity to study the interaction between Arboviruses, agents of parenteral viral hepatitis B and C, and HIV infection in the body of sick people. The aim of this review was to analyze the literature data on the detection of cases of simultaneous infection with Dengue viruses of 1–4 types and agents of blood-borne infections in sick people in the Socialist Republic of Vietnam. Despite the fact that the simultaneous circulation of these pathogens in the patient's body can affect the pathophysiological mechanisms of the disease development, there were very few works devoted to co-infection with Dengue viruses and HIV, hepatitis C or B viruses, including in the regions adjacent to Vietnam. Therefore, research in this direction is promising for both fundamental science and practical medicine.

Key words: dengue viruses of 1–4 types, human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, co-infection, Socialist Republic of Vietnam.

Corresponding author: Yulia V. Ostankova, e-mail: shenna1@yandex.ru.

Citation: Ostankova Yu.V., Naidenova E.V., Serikova E.N., Schemellev A.N., Valutite D.E., Zueva E.B., Huinh Hoang Khanh Thu, Semenov A.V. Regarding Coinfection With Denge Viruses and Agents of Hemocontact Infections in the Socialist Republic of Vietnam. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:6–12. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-6-12.

Received 13.08.2021. Revised 19.08.2021. Accepted 21.09.2021.

Ostankova Yu.V., ORCID: [http://orcid.org/0000-0003-2270-8897](https://orcid.org/0000-0003-2270-8897)
 Naidenova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>
 Serikova E.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>
 Schemelev A.N., ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Valutite D.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0931-102X>
 Zueva E.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>
 Huinh Hoang Khanh Thu, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9199-6103>
 Semenov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире регистрируется более 60 млн случаев заболевания лихорадкой денге в год, из которых около 20 тыс. заканчивается летальным исходом [1]. За последние десятилетия вирусы денге активно распространяются на новые территории. Так, до 1970 г. о случаях инфицирования людей сообщали только 9 государств, в настоящее время они зафиксированы уже в 124 странах Северной и Южной Америки, Африки, Азии и островов Тихого океана, а уровень заболеваемости за эти годы вырос в 30 раз [2]. Есть основания полагать, что распространение вирусов денге на новые территории будет продолжаться. В последние годы эта экзотическая инфекционная болезнь приобретает актуальность и для Российской Федерации. Ежегодно регистрируются завозные случаи лихорадки денге после посещения эндемичных территорий [3].

Еще одной глобальной проблемой здравоохранения во всем мире являются гемоконтактные инфекции, в первую очередь вызванные вирусами гепатитов В (ВГВ) и С (ВГС), а также вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). При оценке данных ВОЗ выявлено, что к 2030 г. количество погибших от вирусных гепатитов во всем мире может превысить 20 млн человек, несмотря на то, что инфицирование ВГВ можно предотвратить путем вакцинации, а эффективность терапии повышается с каждым годом [5]. По официальным данным за 2019 г., общемировое число людей, живущих с ВИЧ, составило 38 млн человек, количество смертельных случаев, связанных со СПИД, составило 690 тыс., а количество новых случаев заражения – более 1,7 млн человек [6].

Как известно, ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты С и В имеют общие эпидемиологические характеристики, в том числе пути передачи за счет обмена биологическими жидкостями при переливании крови, употреблении инъекционных наркотических препаратов, незащищенным половом контакте, использовании острых предметов гигиены без стерилизации [7]. Этот факт способствует тому, что в ряде случаев могут возникать микст-инфекции [8], причем вирусные гепатиты С и В являются одной из основных причин гибели пациентов с ВИЧ-инфекцией. Коинфекция ВГВ и ВГС с ВИЧ ассоциирована с повышенным риском поражения печени и гепатотоксичностью антиретровирусной терапии [9]. Все три вируса широко распространены во многих тропических и субтропических странах, где лихорадка денге является эндемичным заболеванием. Приблизительно 2,5 млрд человек живут в регионах, где лихорадка денге и болезни, ассоциированные с ВИЧ, сопутствуют друг другу, причем могут иметь похожую симптоматику и данные гематологических тестов [10].

В Социалистической Республике Вьетнам (СРВ) в настоящее время складывается уникальная эпидемиологическая ситуация, поскольку ее территория является эндемичной для всех патогенов: вирусов денге 1–4-го типа, ВГВ, ВГС и ВИЧ [11].

Целью настоящей работы является анализ литературных данных о случаях одновременного инфицирования людей вирусами денге и возбудителями гемоконтактных инфекций в Социалистической Республике Вьетнам.

Поиск необходимой информации проводился с помощью поисковых платформ, объединяющих реферативные базы различных интернет-ресурсов (Web of Science, PubMed и др.).

Нельзя исключить, что сочетанное инфицирование вирусами денге и ВИЧ, ВГС или ВГВ может влиять на патофизиологические механизмы развития этих инфекционных болезней, приводить к возникновению клинических особенностей их течения. Однако работ, посвященных изучению случаев подобных коинфекций, сравнительно немного.

Известно, что разные виды вирусов, оказавшиеся в одном макроорганизме, могут проявлять себя разным образом: никак не влиять друг на друга; ингибировать или, напротив, усиливать один другого; конкурировать между собой [12]. Например, коинфекция двумя вирусами может приводить к более легким проявлениям признаков заболеваний, чем это наблюдается при моноинфекции. Так, в 2001–2002 гг. в Гаване (Республика Куба) описаны случаи инфицирования вирусом денге 3-го типа двух пациентов с ВИЧ-инфекцией. Несмотря на тяжелые клинические проявления лихорадки денге, которые регистрировались у больных, количество CD4+ лимфоцитов, которые при ВИЧ-инфицировании поражаются в первую очередь, оставалось в пределах нормы, и не наблюдалось прогрессирования СПИД [13]. Похожая ситуация отмечена в Бразилии, когда при наличии критерии, предполагающих развитие геморрагической лихорадки денге у ВИЧ-инфицированного пациента, никакие опасные для жизни осложнения не развивались [14]. Более того, с помощью анализа мононуклеарных клеток удалось определить, что у больного с острой фазой лихорадки денге снижается инфекционная активность ВИЧ [15]. Подтверждением этого предположения стала серия работ нескольких групп исследователей, которыми с использованием линии CD4(+) Т-клеток, экспрессирующих белок NS5 вирусов денге, показано, что количество ВИЧ в таких клетках уменьшилось на 90 % по сравнению с контрольными образцами. Такая реакция связана, скорее всего, со сниженной экспрессией корецептора CXCR4 и увеличением продукции хемокина SDF-1. Таким образом, неструктурный белок NS5 ингибировал репликацию ВИЧ в условиях *in vitro*, что потенциально объясняет снижение

его вирусной нагрузки, наблюдаемое во время острой стадии лихорадки денге [16]. Пациенты с денге+ВИЧ демонстрировали повышенную экспрессию белков CCR5 и CD107a на субпопуляциях Т-лимфоцитов, что указывает на их активацию или цитотоксичность и миграцию [17]. Тромбоциты в крови больных с данным вариантом коинфекции, вероятно, осуществляют дефектную секрецию хемокинов PF4 и RANTES, что свидетельствует о том, что у ВИЧ-инфицированных лиц экспрессируются более низкие уровни цитокинов во время лихорадки денге по сравнению с больными без коинфекции [18]. Данные факты, по всей видимости, способствуют более легким клиническим проявлениям лихорадки денге у ВИЧ-инфицированных лиц, получающих стабильную антиретровирусную терапию [17].

Однако не все исследователи сообщают о более легком протекании болезни, вызванной вирусами денге, при коинфекции с ВИЧ. Рядом авторов показано, что риск развития тяжелой формы лихорадки денге среди больных с ВИЧ-инфекцией в шесть раз выше по сравнению с пациентами с моноинфекцией [19].

Говоря о коинфекции вирусами денге на фоне вирусных гепатитов В и С (денге+ВГС/ВГВ), необходимо упомянуть, что впервые влияние такого сочетания патогенов на функцию печени анализировали более двадцати лет назад, когда путем измерения уровней трансаминаз в сыворотках крови больных обнаружены аномально высокие уровни ферментов AST и ALT в 97,7 и 37,3 % случаях соответственно, причем не выявлено четких различий при инфицировании только вирусами денге от случаев денге+ВГС/ВГВ [20].

Рядом исследователей показано достоверное снижение вирусной нагрузки ВГС во время острой фазы лихорадки денге, что значительно превышало естественные колебания РНК ВГС у больных при хроническом вирусном гепатите С (ХВГС) [22]. При оценке распространенности коинфекции вирусами денге и возбудителями гемоконтактных инфекций в Мексике получены сведения о том, что персистенция ВГС в крови у пациентов с лихорадкой денге являлась потенциальным риском возникновения тяжелых форм заболевания, вплоть до развития геморрагических проявлений [23].

При изучении взаимодействия вирусов денге и ВГВ выявлен следующий факт: у пациентов как с моноинфекцией, так и больных с коинфекцией (при хроническом течении ВГВ) имели место сходные уровни интерлейкинов IL-4, IL-10 и интерферона гамма (IFN- γ) в крови, а уровни IL-6 и TNF- α были значительно ниже у пациентов с коинфекцией. Наличие в организме ВГВ, по-видимому, изменяет структуру экспрессии цитокинов при заражении пациентов лихорадкой денге [24].

В СРВ одной из самых значимых инфекционных болезней, вызванных арбовирусами, является лихорадка денге за счет своей распространенности по всей территории страны и выявления большого

количества случаев заболевания. Страна также занимает одно из ведущих мест в мире по уровню смертности от рака печени, связанного с ВГВ и ВГС [25].

Впервые вспышки инфекционной болезни, вызванной вирусами денге, выявлены в СРВ в 60-х гг. прошлого столетия на юге страны [26]. В период с 1963 по 1995 год во Вьетнаме зарегистрировано более 1,5 млн случаев геморрагической лихорадки денге и более 14 тыс. летальных исходов [27]. Данные эпидемиологического надзора за лихорадкой денге в этом регионе указывают на возрастание числа случаев заболевания примерно каждые пять лет с 1975 по 1987 год, с более длительным перерывом, предшествующим крупной эпидемии в 1998 г., в период которой зарегистрировано почти 120 тыс. случаев с 342 летальными исходами. Говоря о последующих годах, необходимо отметить вспышку в 2017 г., когда случаи лихорадки денге регистрировали по всей территории Вьетнама и с большим числом заболевших, чем ранее [28]. Высокий уровень заболеваемости лихорадкой денге продолжает оставаться проблемой для здравоохранения СРВ и в последние годы. Так, в 2019 г., когда в мире зафиксировано наибольшее количество случаев лихорадки денге, число зарегистрированных инфицированных лиц во Вьетнаме превышало 320 тыс.

Однако на территории СРВ циркулируют не только вирусы денге. Уровень выявления специфических антител класса IgG к ВГС среди населения составляет от 1,0 до 3,3 % [29]. Распространение хронического гепатита В, которое оценивали на основании выявления поверхностного антигена HBsAg, составляет от 8 до 20 % в общей популяции и от 31 до 54 % среди городского населения [30]. Анализ эпидемиологической ситуации, складывающейся во Вьетнаме, позволил предположить к 2025 г. возникновение примерно 8 млн случаев хронического вирусного гепатита В и 58 тыс. случаев рака печени, связанных с этой инфекционной болезнью, а предполагаемая ежегодная смертность составит примерно 20 тыс. человек в год [31].

Эпидемия ВИЧ-инфекции в СРВ достигла своего пика в начале 2000-х гг., стабилизируясь в последующие годы. В настоящее время показатель распространенности возбудителя среди работоспособного населения (возрастная группа от 15 до 49 лет) составляет до 0,4 % [32]. Согласно оценкам ВОЗ, во Вьетнаме в 2019 г. зарегистрировано более 11 тыс. новых случаев ВИЧ-инфекции и более 8 тыс. смертей вследствие СПИДа. Люди с ВИЧ-инфекцией в большинстве случаев проживают в крупных городах СРВ [33]. В ходе исследований, проведенных в 2018–2019 гг., при выявлении серологических и молекулярных маркеров ВИЧ среди условно здоровых людей г. Хошимина в 1,01 % случаев выявлены антитела к ВИЧ и антигены вируса, у всех этих пациентов обнаружены также вирусная РНК и провирусная ДНК [34]. Среди пациентов, живущих с ВИЧ-инфекцией и получающих антиретровирус-

ную терапию, в 4,75 % случаев выявлена вирусная нагрузка, превышающая порог в 1000 копий/мл, что свидетельствовало о вирусологической неэффективности лечения и распространенности штаммов ВИЧ, обладающих лекарственной устойчивостью [35].

При изучении данных о случаях сочетанного инфицирования вирусами денге и возбудителями гемоконтактных инфекционных болезней, зарегистрированных на территории СРВ, показано, что в 2010 г. среди пациентов с клиническим подозрением на лихорадку денге результаты тестов на антитела к ВГС были положительными только у 3 из 208 обследованных лиц, антитела к HBcore обнаружены в 50 % случаев, а маркер HBsAg выявлен у 11 % больных. При этом уровни фермента ALT в острый период лихорадки денге были достоверно выше у больных с хроническим вирусным гепатитом В, чем у пациентов без коинфекции, но связи между уровнями трансамина и коинфекцией ВГВ в период выздоровления не наблюдали. Наличие гепатита В в анамнезе пациента с лихорадкой денге, по наблюдениям авторов, никак не влияло на тяжесть заболевания, развитие шокового синдрома, уровень тромбоцитопении или на результаты тестов, характеризующих состояние свертывающей системы крови [36].

Нам также пришлось столкнуться со случаями одновременной регистрации у пациентов маркеров возбудителей гемоконтактных инфекций и вирусов денге. Во время проведения скрининговых исследований среди пациентов с гемоконтактными инфекционными болезнями у пяти человек с ВГВ, двух – с ВИЧ, одного – с коинфекцией ВИЧ+ВГВ выявлены специфические антитела класса IgG к вирусам денге. Из трех случаев коинфекции с ВИЧ только у одного пациента вирусная нагрузка была достаточной для проведения дальнейшего секвенирования, хотя все три образца получены от лиц, не получающих антиретровирусную терапию. В случаях коинфекции ВГВ образцы получены от пациентов из трех групп: три пациента из группы условно здоровых лиц, два – с хроническими гепатитами, один – из группы ВИЧ-инфицированных. При этом все шесть случаев представляли собой HBsAg-негативный (оккультный) хронический вирусный гепатит В с вирусной нагрузкой менее 50 МЕ/мл. При анализе показано, что ВГВ представлен субгенотипами B2 (четыре случая) и C2 (два случая). Все образцы B2 были серотипа adr, а образцы C2 – adw2. Ни в одном из образцов не выявлены мутации лекарственной устойчивости, как и мутации вакцинного избегания. Нуклеотидные последовательности полных геномов ВГВ депонированы в международную базу данных GenBank под номерами MW310259–MW310264. Отметим, что во всех случаях коинфекции, несмотря на отсутствие терапии гемоконтактных инфекций в анамнезе и выявление лишь антител класса IgG к возбудителям лихорадки денге, вирусная нагрузка ВИЧ и ВГВ в сыворотках больных очень низка.

Все выявленные в работе случаи денге+ВГВ

относились к оккультной, т.е. HBsAg-негативной форме гепатита В, но оценка распространенности хронического вирусного гепатита В в СРВ ведется на основании регистрации специфического поверхностного антитела ВГВ, что, возможно, и является причиной отсутствия обширной информации о коинфекции. В единичных работах, посвященных оценке распространенности оккультного вирусного гепатита В в регионе, в качестве маркера заболевания указывают на антитела анти-HBcore IgG. Сообщения о случаях выявления у пациентов изолированных анти-HBcore (HBsAg (–), анти-HBs IgG (–) и общего анти-HBcore (+)), которые могли бы рассматриваться как суррогатный маркер оккультной формы болезни в группах высокого риска, представлены только в одном исследовании, сообщающем о данном показателе на уровне 39,7 % [37]. Интересно, что другая исследовательская группа, обнаружив антитела к HBcore в 50 % из 110 HBsAg-отрицательных образцов, сочла это свидетельством значительного количества случаев инфицирования ВГВ [38]. Практически единственная публикация, сообщающая о привлечении молекулярно-биологических методов для выявления HBsAg-негативного вирусного гепатита В при низкой вирусной нагрузке, также свидетельствует о высокой встречаемости оккультной формы заболевания (до 91 % случаев) [39].

Очень мало данных по одновременному выявлению у жителей СРВ маркеров (серологических – антигенов, специфических антител и молекулярно-биологических – РНК/ДНК) вирусов денге и ВГВ/ВГС, а также ВИЧ. Возможно, данная ситуация связана с подавлением репликации возбудителей гемоконтактных инфекционных болезней во время острой фазы лихорадки денге, что не позволяет достоверно идентифицировать все случаи сочетанного инфицирования и приводит, вероятнее всего, к ошибочному представлению о сравнительной редкости ВИЧ-инфекции, хронических вирусных гепатитов В и С у больных лихорадкой денге. Этот вопрос требует дальнейших исследований, в том числе проведения массового ежегодного скрининга с целью выявления серологических и молекулярно-биологических маркеров вирусов денге, гепатитов В и С, ВИЧ у жителей СРВ. Это позволит получить наиболее достоверные сведения о том, могут ли быть взаимосвязаны низкие уровни вирусной нагрузки ВИЧ и возбудителей вирусных гепатитов с наличием лихорадки денге в анамнезе у пациентов.

В связи с тем, что актуальность обсуждаемой проблемы не вызывает сомнений, мы сочли интересным оценить ситуацию с исследованиями в этом направлении и в странах, граничащих с СРВ. Однако информации о коинфекции оказалось мало и в других регионах Юго-Восточной Азии. По оценкам ВОЗ, в Камбодже ежегодно регистрируются примерно 185 тыс. случаев лихорадки денге [40], а в ряде исследований приводятся данные о достаточно высоком уровне инфицирования населения ВГВ

и ВГС [41, 42], однако информации о коинфекции вирусами денге и возбудителями гемоконтактных инфекций в литературе не представлено. Похожим образом обстоят дела с распространностью вышеуказанных вирусов и отсутствием информации о сочетанном инфицировании и в Лаосской Народно-Демократической Республике. В Китае в 2006 г. в г. Гуанчжоу во время вспышки инфекционной болезни, вызванной вирусом денге 1-го типа, среди 353 пациентов выявили 29 человек с хроническим вирусным гепатитом В [24]. При исследовании сывороток крови детей в Таиланде показано, что 58 % ВИЧ-инфицированных и 65 % здоровых имели нейтрализующие антитела против вирусов денге, в большинстве случаев 2-го типа [43]. Есть данные о том, что в Таиланде у женщины с ВИЧ-инфекцией вирусная нагрузка ВИЧ значительно снижалась в острой фазе лихорадки денге [15]. В Сингапуре в 2004–2005 гг. госпитализированы с лихорадкой денге пять ВИЧ-инфицированных больных. Ни в одном случае у пациентов не развилась геморрагическая лихорадка денге, заболевание протекало легко, а выздоровление было без осложнений [44]. Случаи коинфекции проанализировали в Тайване, где в сыворотке крови у 6,21 % больных лихорадкой денге выявлены антитела классов IgM и IgG к ВГС, а у 12 из 32 таких пациентов методом ОТ-ПЦР одновременно выявляли РНК ВГС и вирусов денге [21]. Интересно, что более двадцати лет назад распространность специфических антител к ВГС среди инфицированных вирусами денге пациентов в этом регионе составляла 1,3 % [45]. Это может быть связано как с увеличением реальной распространности вирусов денге и ВГС, так и с совершенствованием методов выявления вирусных маркеров.

Таким образом, работ, посвященных как оценке распространности случаев коинфекции вирусами денге и возбудителями гемоконтактных инфекционных болезней (ВГВ, ВГС и ВИЧ) на территории СРВ, так и анализу взаимодействия указанных патогенов, практически нет. Но данная проблема вызывает несомненный интерес как у ученых-вирусологов, так и у врачей-клиницистов, занимающихся лечением пациентов. Проведение дальнейшей работы в этом направлении актуально, позволит оценить возможность влияния сочетанного инфицирования несколькими патогенами на развитие инфекционного процесса у больных людей и усовершенствовать подходы к терапии.

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

Список литературы

1. World Health Organization Dengue and Severe Dengue. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> Access (дата обращения 20.10.2020).
2. Kroeger A., Nathan M.B. Dengue: setting the global research agenda. *Lancet.* 2006; 368(9554):2193–5. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69873-5.
3. Найденова Е.В., Куклев В.Е., Яшечкин Ю.И., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Современное состояние лабораторной диагностики лихорадки денге (обзор). *Проблемы особо опасных инфекций.* 2013; 4:89–94. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-89-94.
4. Lopez-Gatell H., Alpuche-Aranda C.M., Santos-Preciado J.I., Hernandez-Avila M. Dengue vaccine: local decisions, global consequences. *Bull. World Health Organ.* 2016; 94(11):850–5. DOI: 10.2471/BLT.15.168765.
5. CDC: How viral hepatitis impacts millions of people worldwide. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cdc.gov/hepatitis/awareness/worldhepday.htm> (дата обращения 26.12.2020).
6. UNAIDS. Global HIV and AIDS statistics-2020 fact sheet. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet/> (дата обращения 10.12.2020).
7. Raizada A., Dwivedi S., Bhattacharya S. The hepatitis B, hepatitis C and HIV coinfection at an antiretroviral Centre in Delhi. *Trop Dr.* 2011; 41(3):154–6. DOI: 10.1258/td.2011.100440.
8. Degenhardt L., Charlson F., Stanaway J., Larney S., Alexander L.T., Hickman M., Cowie B., Hall W.D., Strang J., Whiteford H., Vos T. Estimating the burden of disease attributable to injecting drug use as a risk factor for HIV, hepatitis C, and hepatitis B: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect. Dis.* 2016; 16(12):1385–98. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30325-5.
9. Huy B.V., Vernavong K., Kính N.V. HBV and HCV Coinfection among HIV/AIDS Patients in the National Hospital of Tropical Diseases, Vietnam. *AIDS Res. Treat.* 2014; 2014:581021. DOI: 10.1155/2014/581021.
10. Verrall A.J., Seah V., Lye D.C., Leo Y.-S., Archuleta S. High specificity of OraQuick® rapid HIV-1/2 antibody testing during dengue infection. *J. Clin. Virol.* 2020; 131:104584. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104584.
11. General Statistics Office of Vietnam (2019). Completed Results of the 2019 Viet Nam Population and Housing Census. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.gso.gov.vn/wp-content/uploads/2019/12/Ketqua-toanbo-Tong-dieu-tra-dan-so-vanhao-o-2019.pdf> (дата обращения 10.06.2021).
12. Sanjuán R. The Social Life of Viruses. *Annu Rev. Virol.* 2021. DOI: 10.1146/annurev-virology-091919-071712.
13. Gonzalez D., Limonta D., Bandera J.F., Perez J., Kouri G., Guzman M.G. Dual infection with dengue virus 3 and human immunodeficiency virus 1 in Havana, Cuba. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2009; 3(4):318–20. DOI: 10.3855/jidc.131.
14. Mendes W. da S., Branco M. dos R., Medeiros M.N. Clinical case report: dengue hemorrhagic fever in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 74(5):905–7.
15. Watt G., Kantipong P., Jongsakul K. Decrease in human immunodeficiency virus type 1 load during acute dengue fever. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 36(8):1067–9. DOI: 10.1086/374600.
16. McLinden J.H., Stapleton J.T., Chang Q., Xiang J. Expression of the dengue virus type 2 NS5 protein in a CD4(+) T cell line inhibits HIV replication. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(6):860–3. DOI: 10.1086/591254.
17. Torrentes-Carvalho A., Hott E.D., Marinho C.F., da Silva J.B., Pinto L.M., Fialho L.G., Bozza F.A., Cunha R.V., Damasco P.V., Kubelka C.F., de Azereedo E.L. Characterization of clinical and immunological features in patients coinfected with dengue virus and HIV. *Clin. Immunol.* 2016; 164:95–105. DOI: 10.1016/j.clim.2016.01.005.
18. Hott E.D., Quirino-Teixeira A.C., Valls-de-Souza R., Zimmerman G.A., Bozza F.A., Bozza P.T. Platelet function in HIV plus dengue coinfection associates with reduced inflammation and milder dengue illness. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):7096. DOI: 10.1038/s41598-019-43275-7.
19. Pang J., Thein T.L., Lye D.C., Leo Y.S. Differential clinical outcome of dengue infection among patients with and without HIV infection: a matched case-control study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015; 92(6):1156–62. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0031.
20. Nguyen T.L., Nguyen T.H., Tieu N.T. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. *Res. Virol.* 1997; 148(4): 273–7. DOI: 10.1016/s0923-2516(97)88364-1.
21. Liang P.C., Chen K.Y., Huang C.H., Chang K., Lu P.L., Yeh M.L., Huang C.F., Huang C.I., Hsieh M.H., Dai C.Y., Lin Z.Y., Chen S.C., Chuang W.L., Chen Y.H., Huang J.F., Yu M.L. Viral Interference Between Dengue Virus and Hepatitis C Virus Infections. *Open Forum. Infect. Dis.* 2020; 7(8):ofaa272. DOI: 10.1093/ofid/ofaa272.
22. Huang C.F., Jang T.Y., Lu P.L., Yu M.L. Four weeks of paritaprevir/ritonavir/ombitasvir plus dasabuvir encountering dengue fever resulted in sustained virological response in an HCV patient: a case report. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(47):e5304. DOI: 10.1097/MD.0000000000005304.
23. Machain-Williams C., Talavera-Aguilar L., Cetina-Trejo R.C., Carrillo-Navarrete J., Rivero-Cárdenas N., Salazar M.I., Farfán-Ale J.A., Puerto F.I., Castro-Mussot M.E. Detection of hepatitis C

- virus coinfection in patients with dengue diagnosis. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014:321286. DOI: 10.1155/2014/321286.
24. Tang Y., Kou Z., Tang X., Zhang F., Yao X., Liu S., Jin X. Unique Impacts of HBV Co-infection on Clinical and Laboratory Findings in a Recent Dengue Outbreak in China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008; 79(2):154–8. DOI: 10.4269/ajtmh.2008.79.154.
 25. Do S.H., Yamada H., Fujimoto M., Ohisa M., Matsuo J., Akita T., Katayama K., Van Nguyen N., Miyakawa Y., Tanaka J. High prevalences of hepatitis B and C virus infections among adults living in Binh Thuan province, Vietnam. *Hepatol. Res.* 2015; 45(3):259–68. DOI: 10.1111/hepr.12350.
 26. Halstead S.B., Voulgaropoulos E.M., Tien N.H., Udomsakdi S. Dengue hemorrhagic fever in South Vietnam: report of the 1963 outbreak. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1965; 14:819–30. DOI: 10.4269/ajtmh.1965.14.819.
 27. Halstead S.B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: Gubler D.J., Kuno G., editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Oxon, UK: CABI Publishing; 1997.
 28. Decision 1624/QD-BYT 2018 Action plan of the Ministry of Health implementing Resolution 20-NQ/TW 2017 on protection, care and improvement of people's health in the new situation. [Электронный ресурс]. URL: <https://luatvietnam.vn/yte/quyet-dinh-1624-qd-byt-2018-chuong-trinh-hanh-dong-cham-soc-suc-khoe-nhan-dan-161200-d1.html#tomtat> (дата обращения 10.06.2021).
 29. Huy Do S. Epidemiology of Hepatitis B and C Virus Infections and Liver Cancer in Vietnam. *Euroasian. J. Hepatogastroenterol.* 2015; 5(1):49–51. DOI: 10.5005/jp-journals-10018-1130.
 30. Gish R.G., Bui T.D., Nguyen C.T., Nguyen D.T., Tran H.V., Tran D.M., Trinh H.N. Liver disease in Viet Nam: screening, surveillance, management and education: a 5-year plan and call to action. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 27(2):238–47. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06974.x.
 31. Nguyen V.T., Law M.G., Dore G.J. An enormous hepatitis B virus-related liver disease burden projected in Vietnam by 2025. *Liver Int.* 2008; 28(4):525–31. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2007.01646.x.
 32. Viet Nam. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/vietnam> (дата обращения 10.06.2021).
 33. VIETNAM Country Operational Plan (COP/ROP) 2017. Strategic Direction Summary. April 25, 2017. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.state.gov/wp-content/uploads/2019/08/Vietnam-17.pdf> (дата обращения 10.06.2021).
 34. Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Huinh Hoang Khanh Thu, Семенов А.В. Особенности ВИЧ-инфекции на территории Социалистической Республики Вьетнам. В кн.: Попова А.Ю., редактор. Актуальные направления и перспективы Российско-Вьетнамского сотрудничества в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия: коллективная монография. Волгоград: Волга-Пресс; 2019. С. 326–334.
 35. Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Хуйнх Хоанг Кханх Тху, Семенов А.В. Генотипическая и фармакорезистентная характеристика ВИЧ у пациентов в Социалистической Республике Вьетнам. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2020; 12(2):56–68. DOI: 10.22328/2077-9828-2020-12-2-56-68.
 36. Trung D.T., Thao le T.T., Hien T.T., Hung N.T., Vinh N.N., Hien P.T., Chinh N.T., Simmons C., Wills B. Liver involvement associated with dengue infection in adults in Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 83(4):774–80. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.10-0090.
 37. Duong M.C., Le P.V., Pham O.N., Pham H.D., Nguyen T.B., Phan H.T. Patterns of hepatitis B virus exposure and associated predictors in Vietnam: A cross-sectional study. *Asian. Pac. J. Trop. Med.* 2020; 13(12):535–41. DOI: 10.4103/1995-7645.296721.
 38. Dunford L., Carr M.J., Dean J., Nguyen L.T., Ta Thi T.H., Nguyen B.T., Connell J., Coughlan S., Nguyen H.T., Hall W.W., Thi L.A. A multicentre molecular analysis of hepatitis B and blood-borne virus coinfections in Viet Nam. *PLoS One.* 2012; 7(6):e39027. DOI: 10.1371/journal.pone.0039027.
 39. Bui T.X., Nguyen B.V., Tran P.M., Nguyen T.K., Tran Q., Yano Y., Seo Y., Hayashi Y. The preliminary report of occult HBV infection in Vietnamese. *J. Med. Res.* 2007; ID: wpr-250:28–32.
 40. Kumaran E., Doum D., Keo V., Sokha L., Sam B., Chan V., Alexander N., Bradley J., Liverani M., Prasetyo D.B., Rachmat A., Lopes S., Hii J., Rithea L., Shafique M., Hustedt J. Dengue knowledge, attitudes and practices and their impact on community-based vector control in rural Cambodia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(2):e0006268. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006268.
 41. Lynch E., Falq G., Sun C., Bunchhoeung P.D.T., Huerga H., Loarec A., Dousset J.P., Marquardt T., Pailh M.L., Maman D. Hepatitis C viraemic and seroprevalence and risk factors for positivity in Northwest Cambodia: a household cross-sectional serosurvey. *BMC Infect. Dis.* 2021; 21(1):223. DOI: 10.1186/s12879-021-05826-0.
 42. Segeral O., Dim B., Durier C., Prak S., Chhim K., Vong C., Pech S., Tiv S., Nem B., Hout K., Nounhin J., Chhun S., Borand L. Hepatitis B e Antigen (HBeAg) Rapid Test and Alanine Aminotransferase Level-Based Algorithm to Identify Pregnant Women at Risk of HBV Mother-to-Child Transmission: The ANRS 12345 TA PROHM Study. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(10):e587–e593. DOI: 10.1093/cid/ciaa282.
 43. Thisyakorn U., Sretakkraikul K., Hemungkorn M., Thisyakorn C. Seroepidemiology of Dengue Virus Infection in HIV-Infected Children in Comparison to Healthy Children. *J. Med. Assoc. Thai.* 2016; 99(2):175–81.
 44. Siong W.C., Ching T.H., Jong G.C., Pang C.S., Vernon L.J., Sin L.Y. Dengue infections in HIV patients. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2008; 39:260–5.
 45. Wu J.S., Lu C.F., Liu W.T., Lin S.Y. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus (anti-HCV) in different populations in Taiwan. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi.* 1991; 24(1):55–60.

References

1. World Health Organization Dengue and Severe Dengue. (Cited 20 Oct 2020). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
2. Kroeger A., Nathan M.B. Dengue: setting the global research agenda. *Lancet.* 2006; 368(9554):2193–5. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69873-5.
3. Naydenova E.V., Kuklev V.E., Yashechkin Yu.I., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Current state of dengue fever laboratory diagnostics (scientific review). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (4):89–94. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-89-94.
4. Lopez-Gatell H., Alpuche-Aranda C.M., Santos-Preciado J.I., Hernandez-Avila M. Dengue vaccine: local decisions, global consequences. *Bull. World Health Organ.* 2016; 94(11):850–5. DOI: 10.2471/BLT.15.168765.
5. CDC: How viral hepatitis impacts millions of people worldwide. (Cited 26 Dec 2020). [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/hepatitis/awareness/worldhepatitisday.htm>.
6. UNAIDS. Global HIV and AIDS statistics-2020 fact sheet. (Cited 10 Dec 2020). [Internet]. Available from: <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.
7. Raizada A., Dwivedi S., Bhattacharya S. The hepatitis B, hepatitis C and HIV coinfestation at an antiretroviral Centre in Delhi. *Trop Dr.* 2011; 41(3):154–6. DOI: 10.1258/td.2011.100440.
8. Degenhardt L., Charlson F., Stanaway J., Larney S., Alexander L.T., Hickman M., Cowie B., Hall W.D., Strang J., Whiteford H., Vos T. Estimating the burden of disease attributable to injecting drug use as a risk factor for HIV, hepatitis C, and hepatitis B: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect. Dis.* 2016; 16(12):1385–98. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30325-5.
9. Huy B.V., Vernavong K., Kinh N.V. HBV and HCV Coinfection among HIV/AIDS Patients in the National Hospital of Tropical Diseases, Vietnam. *AIDS Res. Treat.* 2014; 2014:581021. DOI: 10.1155/2014/581021.
10. Verrall A.J., Seah S., Lye D.C., Leo Y.-S., Archuleta S. High specificity of OraQuick® rapid HIV-1/2 antibody testing during dengue infection. *J. Clin. Virol.* 2020; 131:104584. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104584.
11. General Statistics Office of Vietnam (2019). Completed Results of the 2019 Viet Nam Population and Housing Census. (Cited 10 June 2020). [Internet]. Available from: <https://www.gso.gov.vn/wp-content/uploads/2019/12/Ket-qua-toan-bo-Tong-dieu-tra-dan-so-va-nha-o-2019.pdf>.
12. Sanjuán R. The Social Life of Viruses. *Annu Rev. Virol.* 2021. DOI: 10.1146/annrev-virology-091919-071712.
13. Gonzalez D., Limonta D., Bandera J.F., Perez J., Kouri G., Guzman M.G. Dual infection with dengue virus 3 and human immunodeficiency virus 1 in Havana, Cuba. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2009; 3(4):318–20. DOI: 10.3855/jidc.131.
14. Mendes W. da S., Branco M. dos R., Medeiros M.N. Clinical case report: dengue hemorrhagic fever in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 74(5):905–7.
15. Watt G., Kantipong P., Jongsakul K. Decrease in human immunodeficiency virus type 1 load during acute dengue fever. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 36(8):1067–9. DOI: 10.1086/374600.
16. McLinden J.H., Stapleton J.T., Chang Q., Xiang J. Expression of the dengue virus type 2 NS5 protein in a CD4(+) T cell line inhibits HIV replication. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(6):860–3. DOI: 10.1086/591254.
17. Torrentes-Carvalho A., Hott E.D., Marinho C.F., da Silva J.B., Pinto L.M., Fialho L.G., Bozza F.A., Cunha R.V., Damasco P.V., Kubelka C.F., de Azeredo E.L. Characterization of clinical and immunological features in patients coinfected with dengue virus and HIV. *Clin. Immunol.* 2016; 164:95–105. DOI: 10.1016/j.clim.2016.01.005.
18. Hott E.D., Quirino-Teixeira A.C., Valls-de-Souza R., Zimmerman G.A., Bozza F.A., Bozza P.T. Platelet function in HIV plus dengue coinfection associates with reduced inflammation and milder dengue illness. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):7096. DOI: 10.1038/s41598-019-47320-w.

- s41598-019-43275-7.
19. Pang J., Thein T.L., Lye D.C., Leo Y.S. Differential clinical outcome of dengue infection among patients with and without HIV infection: a matched case-control study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015; 92(6):1156–62. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0031.
20. Nguyen T.L., Nguyen T.H., Tieu N.T. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. *Res. Virol.* 1997; 148(4): 273–7. DOI: 10.1016/s0923-2516(97)88364-1.
21. Liang P.C., Chen K.Y., Huang C.H., Chang K., Lu P.L., Yeh M.L., Huang C.F., Huang C.I., Hsieh M.H., Dai C.Y., Lin Z.Y., Chen S.C., Chuang W.L., Chen Y.H., Huang J.F., Yu M.L. Viral interference between dengue virus and hepatitis C virus infections. *Open Forum. Infect. Dis.* 2020; 7(8):ofaa272. DOI: 10.1093/ofid/ofaa272.
22. Huang C.F., Jang T.Y., Lu P.L., Yu M.L. Four weeks of paritaprevir/ritonavir/ombitasvir plus dasabuvir encountering dengue fever resulted in sustained virological response in an HCV patient: a case report. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(47):e5304. DOI: 10.1097/MD.00000000000005304.
23. Machain-Williams C., Talavera-Aguilar L., Cetina-Trejo R.C., Carrillo-Navarrete J., Rivero-Cárdenas N., Salazar M.I., Farfán-Ale J.A., Puerto F.I., Castro-Mussot M.E. Detection of hepatitis C virus coinfection in patients with dengue diagnosis. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014:321286. DOI: 10.1155/2014/321286.
24. Tang Y., Kou Z., Tang X., Zhang F., Yao X., Liu S., Jin X. Unique impacts of HBV co-infection on clinical and laboratory findings in a recent dengue outbreak in China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008; 79(2): 154–8. DOI: 10.4269/ajtmh.2008.79.154.
25. Do S.H., Yamada H., Fujimoto M., Ohisa M., Matsuo J., Akita T., Katayama K., Van Nguyen N., Miyakawa Y., Tanaka J. High prevalences of hepatitis B and C virus infections among adults living in Binh Thuan province, Vietnam. *Hepatol. Res.* 2015; 45(3):259–68. DOI: 10.1111/hepr.12350.
26. Halstead S.B., Voulgaropoulos E.M., Tien N.H., Udomsakdi S. Dengue hemorrhagic fever in South Vietnam: report of the 1963 outbreak. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1965; 14:819–30. DOI: 10.4269/ajtmh.1965.14.819
27. Halstead S.B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: Gubler D.J., Kuno G., editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Oxon, UK: CABI Publishing; 1997.
28. Decision 1624/QD-BYT 2018 Action plan of the Ministry of Health implementing Resolution 20-NQ/TW 2017 on protection, care and improvement of people's health in the new situation. (Cited 10 June 2020). [Internet]. Available from: <https://luatvietnam.vn/y-te/quyet-dinh-1624-qd-byt-2018-chuong-trinh-hanh-dong-cham-suc-khoe-nhan-dan-161200-d1.html#tomtat>.
29. Huy Do S. Epidemiology of hepatitis B and C virus infections and liver cancer in Vietnam. *Euroasian. J. Hepatogastroenterol.* 2015; 5(1):49–51. DOI: 10.5005/jp-journals-10018-1130.
30. Gish R.G., Bui T.D., Nguyen C.T., Nguyen D.T., Tran H.V., Tran D.M., Trinh H.N. Liver disease in Viet Nam: screening, surveillance, management and education: a 5-year plan and call to action. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 27(2):238–47. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06974.x.
31. Nguyen V.T., Law M.G., Dore G.J. An enormous hepatitis B virus-related liver disease burden projected in Vietnam by 2025. *Liver Int.* 2008; 28(4):525–31. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2007.01646.x.
32. Viet Nam. (Cited 10 June 2020). [Internet]. Available from: <https://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/vietnam>.
33. Vietnam Country Operational Plan (COP/ROP) 2017. Strategic Direction Summary. April 25, 2017. (Cited 10 June 2020). [Internet]. Available from: <https://www.state.gov/wp-content/uploads/2019/08/Vietnam-17.pdf>.
34. Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Huinh Hoang Khanh Thu, Semenov A.V. Features of HIV infection in the territory of the Socialist Republic of Vietnam. In: Popova A.Yu., editor. *Relevant Areas and Prospects of Russian-Vietnamese Cooperation in the Field of Ensuring Sanitary and Epidemiological Well-Being: Collective Monograph*. Volgograd: LLC "Publishing house "Volga-Press"; 2019. P. 326–334. (In Russ.).
35. Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Khanh Thu Huinh Thu., Semenov A.V. Genotypic and pharmacoresistant HIV characteristics in patients in the Socialist Republic of Vietnam. *VICH Infektsia i Immunosupressii [HIV Infection and Immunosuppressive Disorders]*. 2020; 12(2):56–68. (In Russ.) DOI: 10.22328/2077-9828-2020-12-2-56-68.
36. Trung D.T., Thao le T.T., Hien T.T., Hung N.T., Vinh N.N., Hien P.T., Chinh N.T., Simmons C., Wills B. Liver involvement associated with dengue infection in adults in Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 83(4):774–80. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.10-0090.
37. Duong M.C., Le P.V., Pham O.N., Pham H.D., Nguyen T.B., Phan H.T. Patterns of hepatitis B virus exposure and associated predictors in Vietnam: A cross-sectional study. *Asian. Pac. J. Trop. Med.* 2020; 13(12):535–41. DOI: 10.4103/1995-7645.296721.
38. Dunford L., Carr M.J., Dean J., Nguyen L.T., Ta Thi T.H., Nguyen B.T., Connell J., Coughlan S., Nguyen H.T., Hall W.W., Thi L.A. A multicentre molecular analysis of hepatitis B and blood-borne virus coinfections in Viet Nam. *PLoS One*. 2012; 7(6):e39027. DOI: 10.1371/journal.pone.0039027.
39. Bui T. X., Nguyen B. V., Tran P. M., Nguyen T. K., Tran Q., Yano Y., Seo Y., Hayashi Y. The preliminary report of occult HBV infection in Vietnamese. *J. Med. Res.* 2007; ID: wpr-250:28–32.
40. Kumaran E., Doum D., Keo V., Sokha L., Sam B., Chan V., Alexander N., Bradley J., Liverani M., Prasetyo D.B., Rachmat A., Lopes S., Hii J., Rithea L., Shafique M., Hustedt J. Dengue knowledge, attitudes and practices and their impact on community-based vector control in rural Cambodia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(2):e0006268. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006268.
41. Lynch E., Falq G., Sun C., Bunchhoeung P.D.T., Huerga H., Loarec A., Dousset J.P., Marquardt T., Pain M.L., Maman D. Hepatitis C viraemic and seroprevalence and risk factors for positivity in Northwest Cambodia: a household cross-sectional serosurvey. *BMC Infect. Dis.* 2021; 21(1):223. DOI: 10.1186/s12879-021-05826-0.
42. Segeral O., Dim B., Durier C., Prak S., Chhim K., Vong C., Pech S., Tiv S., Nem B., Hout K., Nouhin J., Chhun S., Borand L. Hepatitis B e antigen (HBeAg) rapid test and alanine aminotransferase level-based algorithm to identify pregnant women at risk of HBV mother-to-child transmission: The ANRS 12345 TA PROHM Study. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(10):e587–e593. DOI: 10.1093/cid/ciaa282.
43. Thisyakorn U., Srettakraikul K., Hemungkorn M., Thisyakorn C. Seroepidemiology of Dengue Virus Infection in HIV-Infected Children in Comparison to Healthy Children. *J. Med. Assoc. Thai.* 2016; 99(2):175–81.
44. Siong W.C., Ching T.H., Jong G.C., Pang C.S., Vernon L.J., Sin L.Y. Dengue infections in HIV patients. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2008; 39:260–5.
45. Wu J.S., Lu C.F., Liu W.T., Lin S.Y. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus (anti-HCV) in different populations in Taiwan. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi.* 1991; 24(1):55–60.

Authors:

Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Shchemelev A.N., Valutite D.E., Zueva E.V. St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 14, Mira St., St. Petersburg, Russian Federation, 197101. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Naidenova E.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, Russian Federation, 410005. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Huinh Hoang Khanh Thu. Pasteur Institute in Ho Chi Minh City. 167, Pasteur St., Ho Chi Minh City, Vietnam, 72400.

Semenov A.V. Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections FBIS SSC VB "Vector". 23, Letnyaya St., Yekaterinburg, Russian Federation, 620030. E-mail: virus@eniivi.ru.

Об авторах:

Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Валутите Д.Э., Зуева Е.В. Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Наиденова Е.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российской Федерации, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Хуйнх Хоанг Кханх Тху. Институт имени Пастера в г. Хошимин. Вьетнам, 72400, Хошимин, ул. Пастера, 167.

Семенов А.В. Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Российской Федерации, 620030, Екатеринбург, ул. Летняя, 23. E-mail: virus@eniivi.ru.

DOI 10.21055/0370-1069-2021-3-13-22

УДК 616.98:578.828HIV

**Л.Ф. Стобба, С.А. Мельников, Д.И. Павельев, В.Т. Кротков, Н.К. Черникова,
В.Н. Лебедев, С.В. Борисевич**

**АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ
РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА ВАКЦИНЫ, ШТАММ MVA,
ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ГЕНЫ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА**

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

Успехи антиретровирусной терапии (АРТ) превратили синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) из некогда смертельной болезни в вяло прогрессирующую заболевание, однако его профилактика и терапия по-прежнему остаются одной из важнейших социально значимых проблем. Увеличение числа пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), особенно в США, Южной Америке и Европе, диктует наущную необходимость создания вакцины. Существующая практика вакцинации показала эффективность схем праймирования/бустирования для формирования выраженного иммунного ответа. Поскольку антивекторный иммунитет праймирующего вектора может ограничивать ответ при бустерной вакцинации той же вакциной, при иммунизации используют гетерологичные векторные конструкции. Идеальная вакцина против СПИДа должна не только предотвращать диссеминацию вируса и контролировать его репликацию, но и быть безопасной для ВИЧ-инфицированного контингента. Вакцинация у ВИЧ-инфицированных пациентов применяется для увеличения иммуноопосредованной элиминации персистентно ВИЧ-инфицированных CD4⁺ Т-клеток на протяжении длительной АРТ с целью удаления латентно инфицированных вирусных резервуаров. В обзоре анализируются результаты испытаний ДНК-анти-ВИЧ/СПИД вакцин и рекомбинантного штамма MVA вируса вакцины, экспрессирующих различные сочетания генов ВИЧ, которые показали безопасность и хорошую переносимость вакцинации как не инфицированными ВИЧ, так и ВИЧ-инфицированными волонтерами. При анализируемых схемах вакцинации индуцировался клеточный и гуморальный иммунные ответы у всех волонтеров. И хотя нет данных о том, что не инфицированные ВИЧ волонтеры, отобранные из групп невысокого поведенческого риска, заболевали СПИДом, на настоящий момент нет оснований, чтобы сделать вывод о достаточности индуцированного иммунного ответа для профилактики риска возможного заражения ВИЧ.

Ключевые слова: ВИЧ, СПИД, штамм MVA, праймирование, бустирование, клиническое испытание, антиретровирусная терапия.

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

Для цитирования: Стобба Л.Ф., Мельников С.А., Павельев Д.И., Кротков В.Т., Черникова Н.К., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Анализ результатов клинических испытаний рекомбинантного вируса вакцины, штамм MVA, экспрессирующего гены вируса иммунодефицита человека. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; 3:13–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-13-22.

Поступила 09.01.2020. Отправлена на доработку 27.01.2020. Принята к публ. 15.01.2021.

**L.F. Stovba, S.A. Mel'nikov, D.I. Pavel'ev, V.T. Krotkov, N.K. Chernikova, V.N. Lebedev,
S.V. Borisevich**

**THE RESULTS OF CLINICAL TRIALS OF RECOMBINANT VACCINE VIRUS, MVA STRAIN,
EXPRESSING GENES OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS**

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

Abstract. Although successes in antiretroviral therapy (ART) turned AIDS from lethal illness into sluggishly progressing disease, its prevention and treatment remain one of the most socially significant concerns. The increase in the number of patients infected with human immunodeficiency virus (HIV), especially in the USA, South America and Europe, determines the need in creating a vaccine against this disease. Existing vaccination practice has demonstrated efficiency of priming/boosting scheme for the development of immune responses. As anti-vector immunity of priming vector can constrain the response to boosting immunization with the same vaccine, heterologous priming/boosting vector constructs are used. An ideal AIDS vaccine would prevent virus dissemination and control viral replication, but it also must be safe for HIV-infected contingent. The vaccination of HIV-infected individuals is used for enhancing immune-mediated elimination of persistently HIV-infected CD4⁺ T-cells during long-term ART in order to purge the latently infected viral reservoirs. The paper considers the results of clinical trials of DNA-anti-HIV/AIDS vaccines and recombinant MVA strain of vaccinia virus, expressing different combination of HIV genes, which demonstrated the safety and tolerability both, in HIV-infected and non-HIV-infected volunteers. All implemented schedules of vaccination induced cell-mediated and humoral immune responses in all volunteers. And though there are no data on acquiring AIDS by HIV-uninfected volunteers from groups at low risk of HIV-infection, there are no grounds to conclude the sufficiency of induced protection for the prevention of possible HIV infection.

Key words: HIV, AIDS, MVA strain, priming, boosting, clinical trial, antiretroviral therapy.

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

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

Citation: Stovba L.F., Mel'nikov S.A., Paveli'ev D.I., Krotkov V.T., Chernikova N.K., Lebedev V.N., Borisevich S.V. The Results of Clinical Trials of Recombinant Vaccine Virus, MVA Strain, Expressing Genes of Human Immunodeficiency Virus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:13–22. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-13-22.

Received 09.01.2020. Revised 27.01.2020. Accepted 15.01.2021.

Stovba L.F., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7985-5516>
 Mel'nikov S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2147-4729>
 Paveli'ev D.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3204-1897>
 Krotkov V.T., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7674-2321>

Chernikova N.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1491-6293>
 Lebedev V.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6552-4599>
 Borisevich S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Лица, инфицированные вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), могут быть иммунизированы только вакцинами, не вызывающими системные побочные реакции, поэтому целью данного обзора являлся анализ результатов клинических испытаний одних из самых безопасных векторных вакцин на основе рекомбинантных вирусов вакцины и ДНК-вакцин.

В настоящее время разрабатываются и оцениваются различные кандидаты в вакцины на основе ряда векторов: аденоовириуса шимпанзе [1], вируса везикулярного стоматита [2], альфавирусных репликонов [3], палочки Кальметта – Гирена [4, 5]. Все эти кандидаты в вакцины индуцировали специфический иммунитет, вызывая при этом побочные реакции, но данные об уровне их эффективности были неоднозначными. Так, в двух плацебо-контролируемых исследованиях II фазы [6, 7] для иммунизации использовалась смесь трех рекомбинантных нереплицирующихся аденоовириусных векторов 5-го типа, экспрессирующих gag, pol, nef белки ВИЧ-1. При испытании в опытной группе из 914 человек зарегистрировано 49 новых случаев заражения синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИДом), а в контрольной – из 922 человек – 33 случая. В другом испытании количество вновь инфицированных волонтеров в опытной группе (33) также превышало количество в контрольной (28 человек) [7].

Умеренный протективный эффект (31,1 %) получен в 2009 г. в Таиланде в единственном испытании RV144 Thai, в котором участвовали 16395 гетеросексуальных мужчин и женщин, иммунизированных векторной вакциной на основе рекомбинантного вируса оспы канареек, экспрессирующего gag, протеазу и env белки ВИЧ-1 [8]. Проведены две вакцинации этим вектором и две вакцинации этим же вектором с добавлением к нему мономерного оболочечного белка AIDSVAX B/E gp120. Испытание длилось 42 месяца, в течение которых волонтеры вели обычный образ жизни. По истечении этого срока наблюдения в контрольной группе из 8198 человек зафиксировано 74 новых случая заболевания СПИДом, а в иммунизированной группе из 8197 человек – 51. При этой иммунизации не индуцировалось измеримое количество CD8⁺ Т-клеток, однако индуцировались CD4⁺ Т-клетки и антитела, ассоциированные с антителозависимой клеточной цитотоксичностью.

Принимая во внимание особенности контингента, который будет иммунизирован против СПИДа, следует применять вакцины на основе таких векторов, которые должны индуцировать не только гуморальный и клеточный иммунные ответы, способные защитить от дальнейшего возможного заражения

СПИДом, но и не будут вызывать системные побочные реакции. В связи с этим основными кандидатами в векторные вакцины против СПИДа являются ДНК-вакцины и рекомбинантный вирус вакцины (ВВ) [9] ввиду их безопасности для людей пожилого возраста, лиц с иммунодефицитными состояниями, хроническими кожными заболеваниями, больных туберкулезом. К преимуществам ВВ как вектора относят его генетическую стабильность и способность к встраиванию в геном большого количества чужеродной генетической информации [9].

Однако при вакцинации противооспенными вакцинами первого и второго поколений в современных условиях отсутствия популяционного иммунитета к ортопоксвирусы существуют серьезный риск осложнений. Так, при иммунизации ВВ военнослужащих армии США с бессимптомной ВИЧ-инфекцией и нормальным количеством CD4⁺ Т-клеток отмечена диссеминированная вакцинация [10]. Поэтому для конструирования рекомбинантов применяют аттенуированные штаммы ВВ, используемые для вакцин третьего поколения.

Для оценки безопасности и иммуногенности одного из наиболее аттенуированных штаммов вируса вакцины – MVA(modified vaccinia Ankara) – у лиц с высокой вероятностью осложнений проведены клинические испытания фазы I/II на здоровых (60 человек) и больных СПИДом (91 человек) с содержанием РНК в плазме <400 копий/мл и концентрацией CD4⁺ ≤350 клеток/мм³ волонтерах, часть из которых была ранее вакцинирована оспенной вакциной (табл. 1), при этом ВИЧ-инфицированные волонтеры получали антиретровирусную терапию [11].

В результате исследований установили, что оспенная вакцина на основе штамма MVA (далее – MVA-вакцина) безопасна и хорошо переносится здоровыми и ВИЧ-инфицированными лицами, вызывая приблизительно одинаковые иммунные ответы [11].

Этот вакциненный штамм также использован при проведении иммунизации у более чем 120 тыс. человек, включая детей и лиц с иммунодефицитностью, для праймирования перед применением традиционных оспенных вакцин первого и второго поколений [12]. При этом серьезных побочных реакций не выявлено.

В клинических испытаниях по применению рекомбинантного штамма MVA, содержащего один из основных иммунодоминантных эпитопов возбудителя туберкулеза – 85A, показано, что этот штамм не вызывал тяжелых побочных явлений у лиц, больных СПИДом, латентной формой туберкулеза, а также подростков и детей [13].

Следовательно, исследования, проведенные

Таблица 1 / Table 1

Общая характеристика испытаний по оценке эффективности применения препаратов на основе рекомбинантного вируса вакцины, штамм MVA, экспрессирующего антигены ВИЧ-1

General characterization of trials on estimation of effectiveness of preparations on the basis of recombinant vaccine virus, MVA strain, expressing HIV-1 antigens

Место проведения Trial venue	Сроки проведения, год Terms of trial, year	Количество волонтеров Number of volunteers	Возраст волонтеров (средний возраст), лет Volunteer age, (median age), years	Медицинский статус волонтеров Health status of volunteers	Источник литературы References
США USA	2012	151	18–55	60 здоровых, 91 больной СПИДом 60 healthy and 91 volunteers with AIDS	11
США USA	2012	150	18–55	Здоровые, ВВ неиммунизированные Healthy and vaccinia naive volunteers	17
Индия India	2009–2010	32	Взрослые Adults	Не инфицированные ВИЧ HIV-uninfected	21
США, Перу USA, Peru	2012	299	18–50 (25)		22
США USA	2010	120	18–49 (24)		24
Танзания Tanzania	2010–2011	120	18–40		26
Швеция Sweden	2005–2006	40	18–60		27
Швеция Sweden	2009	24	18–60		28
США USA	2012	48	18–50 (25)		29
США, ЮАР USA, RSA	2015	48	18–45		30
Испания Spain	2009	30	Взрослые Adults		33
Испания Spain	2013–2014	13	18–55		34
Испания Spain	2011–2013	30	Взрослые Adults	ВИЧ-инфицированные HIV-infected	37
Великобритания Great Britain	2015–2016	19	18–60		40

как со штаммом MVA, так и с векторными рекомбинантными вакцинами на его основе [11–14], а также результаты доклинических испытаний на лабораторных животных, иммунизированных рекомбинантными MVA-вакцинами, экспрессирующими антигены ВИЧ, свидетельствуют, что штамм вызывает не только антивекторный иммунитет, но и иммунный ответ на белки, экспрессируемые встроенными генами [15, 16].

Применение прайм/бустерного режима при иммунизации MVA-вакцинами. Антивекторный иммунный ответ, развивающийся при первичной иммунизации, в дальнейшем ограничивает иммунный ответ к этому же вектору и продуктам экспрессии встроенных генов. Гетерологичное праймирование/бустирование с разными векторами позволяет обойти иммунный ответ против праймирующего вектора. Для сравнительной оценки безопасности и иммуногенности гетерологичного прайм/бустерного режима вакцинации по сравнению с гомологичным режимом проведен ряд испытаний. Необходимо отметить, что все описываемые далее испытания были рандомизированными, слепыми, с использованием в качестве контроля группы лиц, получивших плацебо.

Преимущества гетерологичного прайм/бустерного режима вакцинации показаны в ходе испытания I фазы, проведенного в США и Бразилии. Иммунизация осуществлялась двумя парами векто-

ров. Первая пара содержала рекомбинантный вирус вакцины, штамм MVA (MVA-HIV), и рекомбинантный вирус оспы канареек (FPV) (FPV-HIV), экспрессирующие встроенные структурные гены ВИЧ-1, вторая – те же векторы, экспрессирующие регуляторные гены [17]. Волонтеры были рандомизированно разделены на две группы. Для иммунизации группы А использовали только MVA-HIV (M/M группа), группы В – MVA-HIV и FPV-HIV (M/F группа).

Установлено, что при однократном введении обе вакцины были слабо иммуногенны, особенно FPV-HIV вакцина, даже при применении высоких доз. Однако будучи примененной в качестве бустерной вакцины, она усиливала CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ у волонтеров, праймированных разными дозами вакцины MVA-HIV (табл. 2). Кроме того, выявлено, что вектор-специфический гуморальный иммунный ответ, вызываемый MVA-HIV, не препятствовал развитию клеточного и гуморального иммунных ответов против ВИЧ-экспрессируемых антигенов. Следовательно, хотя иммуногенность показана для обеих вакцин, лучшие результаты получены при гетерологичном бустировании [17, 18].

Во многих исследованиях на приматах и людях выявлено, что плазмидные ДНК-вакцины индуцируют у испытуемых клеточный и гуморальный иммунный ответы. Использование комбинации ДНК-вакцин, как наиболее безопасных векторов, с дру-

гими вакцинными векторами, например вирусными, в стратегии прайм/бустерной иммунизации может усилить противовирусный иммунный ответ [19, 20].

Поэтому с апреля 2009 г. по декабрь 2010 г. проводилось испытание I фазы в двух штатах Индии. Были изучены две схемы вакцинации: схема А – праймирование двумя дозами ДНК-вакцины и бустирование двумя дозами рекомбинантной MVA-вакцины, схема В – трехкратное введение рекомбинантной MVA-вакцины [21]. Выявлено, что обе вакцины безопасны и хорошо переносились всеми волонтерами. Побочных явлений при инъектировании ДНК-вакцины либо не наблюдалось вообще, либо они проявлялись только болезненностью в месте введения. Серьезных побочных явлений, связанных с вакцинацией, не отмечали. Характерно, что во всех испытаниях выявлены слабые аналогичные побочные явления.

Определение иммунного ответа показало, что ВИЧ-специфические связывающие антитела появлялись только после первого и второго бустирования MVA-вакциной в группе А и после второй и третьей инъекции MVA-вакцины в группе В. К третьему месяцу после последней вакцинации у всех волонтеров выявлено наличие ВИЧ-1-связывающих антител, которые к 12-му месяцу сохранялись только у незначительной части волонтеров из обеих групп. Титры нейтрализующих антител были выше в группе В.

Положительный клеточный иммунный ответ у всех волонтеров из группы А выявлялся после первой и второй вакцинации MVA-вакциной, в группе В – примерно у половины волонтеров он обнаруживался после первой и второй вакцинации и почти у всех только после третьей вакцинации MVA-вакциной. Исходя из результатов этого испытания можно сделать вывод, что праймирование ДНК-вакциной не оказывало значительного влияния на индуцирование иммунного ответа [21].

Оценка биологической безопасности, иммуногенности и длительности иммунного ответа против ВИЧ в течение шести месяцев была проведена в ходе испытания Ia фазы в США и Перу [22]. Праймирование проводили pGA2/J57 ДНК-вакциной, продуцирующей вирусоподобные частицы с мембран-связанной трехмерной формой оболочки [23]. Бустирование осуществляли вакциной MVA62B, кодирующими те же гены, что и ДНК-вакцина.

В группе А волонтеры были праймированы дважды ДНК-вакциной, а бустированы дважды вакциной MVA62B (схема DDMM). В группе В часть волонтеров вакцинировали по схеме DDMM, другую часть – трижды MVA62B-вакциной (схема MMM).

Индукцированный вакцинацией иммунный ответ, представленный IgG- и IgA-иммуноглобулинами, выявлен у 84 % реципиентов в группе DDMM, у 87,7 % – в группе MMM. При обеих схемах иммунизации отмечена индукция специфических нейтрализующих антител. Т-клеточный иммунный ответ выявлялся у меньшего количества реципиентов: CD4⁺ – у 66 % волонтеров из группы DDMM и

у 43 % из группы MMM; CD8⁺ – у 22 % волонтеров из группы DDMM и 15 % из группы MMM. На протяжении шестимесячного периода наблюдения напряженность клеточного и гуморального иммунных ответов снизилась менее чем в три раза.

Сравнение этих двух схем иммунизации показывает преимущества схемы MMM при формировании гуморального иммунитета и схемы DDMM – при формировании клеточного иммунитета. Поскольку ответ антител после второго введения MVA62B-вакцины по схеме DDMM подобен таковому по схеме MMM, то авторы предлагают для бустирования проводить трехкратное введение вакцины MVA62B [22].

Целесообразность проведения праймирования ДНК-вакциной также показана в испытании I фазы, проведенном на здоровых, не инфицированных ВИЧ волонтерах в шести центрах США [24].

Применяемые вакцины против ВИЧ должны экспрессировать многие иммуногены, чтобы охватить все разнообразие белковых последовательностей этого вируса [25]. Поэтому в испытании Ia фазы, проведенном в Танзании в 2010–2011 гг. [26], применялись вакцины, содержащие гены различных субтипов ВИЧ. Волонтеров трижды праймировали ДНК-вакциной, которая состояла из семи плазмид, кодирующих гены ВИЧ-1 субтипов A, B и C, бустирование проводили дважды рекомбинантной MVA-вакциной, экспрессирующими белки из клайдов A и E.

Вакцинация индуцировала низкий титр антител против ВИЧ. Первое бустирование индуцировало клеточный иммунный ответ, представленный в большей степени CD4⁺ Т-клетками, чем CD8⁺. После второго бустирования количество волонтеров с индуцирующимися CD8⁺ Т-клетками повышалось [26].

Влияние молекулярного адьюванта на уровень иммунного ответа. В 2005–2006 гг. в Швеции (Стокгольм) проведено испытание на 40 не инфицированных ВИЧ волонтерах с целью оценки индуцированного иммунного ответа при различных способах и дозах введения вакцин и влияния гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) в качестве молекулярного адьюванта [27]. Праймирование проводилось трижды ДНК-вакциной в сочетании с подкожным введением ГМ-КСФ в количестве 150 мкг или без него. Бустирование осуществлялось MVA-вакциной, которая вводилась однократно в дозе 10⁷ БОЕ через шесть месяцев после последней ДНК-вакцинации при внутрикожном введении и 10⁸ БОЕ – при внутримышечном.

После введения праймирующей ДНК-вакцины у 30 % волонтеров выявлен ВИЧ-специфический интерферон-γ (IFN-γ), продуцируемый как CD8⁺, так и CD4⁺ Т-клетками, после введения MVA-вакцины – у 92 %. У 62 % вакцинированных выявлялся позитивный интерлейкин-2 ответ, а у 92 % – лимфопролиферативный. При оценке эффективности вакцинации в зависимости от дозы показано, что 1 мг ДНК-вакцины при внутрикожном введении равнозависимо эффективен 4 мг при внутримышечном введении.

Таблица 2 / Table 2

Характеристика векторных вакцин для прайм/бустерной иммунизации против СПИДа
Characterization of vector vaccines for prime-boost immunization against AIDS

Вектор Vector	Праймирование Priming	Бустирование Boosting				Источник литературы References
		Доза вакцины Dose of vaccine	Метод введения Method of administra- tion	Вектор Vector	Экспрессируемые гены Expressed genes	
MVA	Вектор Vector Экспрессируемые гены Expressed genes	1·10 ⁷ – 1·10 ⁹ БОЕ / PFU	FPV	В первой паре – структурные Env-gag. Во второй паре – регуляторные Tat-rev-nef/RT субтипа В In the first pair – structural Env-gag. In the second pair – regulatory Tat-rev-nef/RT subtype B	В второй паре – структурные Env-gag. Во второй паре – регуляторные Tat-rev-nef/RT субтипа В In first pair – structural Env-gag. In second pair – regulatory Tat-rev-nef/RT subtype B	1·10 ⁹ БОЕ / PFU
DНК-вакцина DNA-Vaccine	Env gp160, gag, pol, nef/tat субтипа С Env gp160, gag, pol, nef/tat subtype C	4 мг / mg	B/M i.m	Env gp160, gag, tat, RT, rev, nef субтипа С Env gp160, gag, pol, nef/tat subtype C	5·10 ⁶ БОЕ / PFU	21
DНК-вакцина DNA-Vaccine	Gag, обратная транскриптаза, протеаза, Tat, Rev, Vpr из клайда B, env из ВIV ADA Gag, reverse transcriptase, protease, Tat, Rev, Vpr from clade B, env from HIV ADA	3 мг / mg	MVA	Gag, обратная транскриптаза, протеаза, Env из тех же последовательностей, что и ДНК-вакцина Gag, reverse transcriptase, protease, Env from the same sequences as DNA-vaccine	B/M i.m	17
DНК-вакцина DNA-Vaccine	Gag, PR, RT, Env, Tat, Rev, Vpr из штаммов HXB-2, ADA Gag, PR, RT, Env, Tat, Rev, Vpr from strains HXB-2, ADA	3 мг / mg	MVA	Gag, PR, RT, env из штаммов HXB-2, ADA Gag, PR, RT, env from strains HXB-2, ADA	10 ⁸ TCID ₅₀	22
DНК-вакцина DNA-Vaccine	Env субтипов A, B, C, Rev клайда B, gag субтипов A, A/B, Env A, B, C, Rev клайда B, gag субтипы A, A/B, обратная транскриптаза субтипа B Env A, B, C, Rev subtype A, B, C, Rev subtype B, gag subtype A, B, reverse transcriptase subtype B	1 мг / mg	B/K i.d	Env субтипа E, gag/pol субтипа A Gp150 clade E, gag, pol clade A	10 ⁸ БОЕ / PFU	24
DНК-вакцина DNA-Vaccine + GM CSF	Gp160 субтипов A, B, C, Rev субтипа B, gag субтипа A, B, Env 160 subtypes A, B, C, Rev subtype B, gag subtype A, B, RT субтипа B Rev субтипы A, B, C, Rev subtype B, gag subtype A, B, Env 160 subtype B	1 мг / mg 4 мг / mg 150 мкг / µg	MVA	Env субтипа E, gag/pol субтипа A Env subtype E, gag/pol subtype A	10 ⁷ БОЕ / PFU 10 ⁸ БОЕ / PFU	26
DНК-вакцина DNA-Vaccine + GM CSF	Праймирование выполнено ДНК- и MVA-вакцинами в испытании [27] Priming is carried out using DNA- and MVA-vaccines [27]		MVA	Env субтипа E, gag/pol субтипа A Env subtype E, gag/pol subtype A	10 ⁸ БОЕ / PFU	27
DНК-вакцина DNA-Vaccine + GM CSF	Неинфекционные вирусоподобные частицы из клайда В HIV-HXB2/BH10 (gag-pol) HIV-ADA. Коэкспрессия ТМ KCF Noninfectious virus-like particles from clade B HIV-HXB2/ BH10 (gag-pol) HIV-ADA. Co-expression GM-CSF	235 нг / ng	MVA	Неинфекционные вирусоподобные частицы с тех же последовательностей Not-infectious virus-like particles from the same sequences	10 ⁸ TCID ₅₀	28
DНК-вакцина DNA-Vaccine	Gag, обратная транскриптаза, Tat, nef из изолят DU422, gp150CT из изолята DU151 Gag, reverse transcriptase, Tat, nef from isolate DU422, gp150CT from isolate DU151	4 мг / mg	MVA+ Gp140/ MF59	Gag, обратная транскриптаза, Tat, nef из изолята DU422, Env150CT из изолята DU151, Gp140 субтипа С Gag, reverse transcriptase, Tat, nef from isolate DU422, Env150CT from isolate DU151, Gp140 subtype C	1,45·10 ⁹ БОЕ / PFU 100 мкг / µg	29
MVA	Env, gag, pol, nef из клайда B Env, gag, pol, nef from clade B	1·10 ⁸ БОЕ / PFU	MVA	Env, gag, pol, nef из клайда B Env, gag, pol, nef from clade B	1·10 ⁸ БОЕ / PFU	30
MVA	Праймирование выполнено согласно испытанию [33] Priming is performed according to trial scheme [33]		MVA	Env, gag, pol, nef из клайда B Env, gag, pol, nef from clade B	1·10 ⁸ БОЕ / PFU	33
MVA	Мономерный Gp120 из изолят BX08, gag, pol, nef (GPN) клайда IIIB как полипротеин в 160KDa Monomeric Gp120 from the isolate BX08, gag, pol, nef (GPN) of the clone IIIB as poly-protein of 160KDa	10 ⁸ БОЕ / PFU		Не проводили Was not performed		34
MVA	HIV-conservimmunogen, представленный gag, pol, vif, env белками	5·5·10 ⁷ 2·2·10 ⁸ БОЕ / PFU		Не проводили Was not performed		37
MVA	HIV-conserv proteins	B/M i.m				40

После бустирования MVA-вакциной лучший ВИЧ-специфический иммунный ответ наблюдался у волонтеров, вакцинированных внутримышечно более высокой ($1,0 \cdot 10^8$ БОЕ) дозой. Добавление ГМ-КСФ не повышало иммунный ответ и не компенсировало применение более низких доз ДНК-вакцины, т.е. этот цитокин не оказывал адъюванного действия в данном испытании [27].

Испытание [27] продолжилось через 38 месяцев после бустерной иммунизации MVA-вакциной [28]. Из волонтеров отобрали 24 человека, которые были вторично бустированы MVA-вакциной. Перед вакцинацией у всех волонтеров брали анализы на наличие иммунного ответа к ВИЧ. У 87 % наблюдался выраженный иммунный ответ, что свидетельствует о положительном результате первичного испытания, которое обеспечивало развитие напряженного клеточного иммунитета на протяжении следующих более чем трех лет. Рекомбинантный вирус вакцины, штамм MVA, для вторичного бустирования экспрессировал те же белки, что и для первичного бустирования [27]. Через две недели после вакцинации у 82 % волонтеров выявлен IFN- γ к белкам gag и env, через четыре недели – у 70 % к gag и у 30 % к env, через шесть месяцев – у 37 % к gag и у 12 % к env. CD8 $^{+}$ и CD4 $^{+}$ Т-клеточные ответы были полифункциональными. CD8 $^{+}$ Т-клеточный ответ выявлялся более к gag (у 69 % волонтеров), чем к env (у 28 % волонтеров), в то время как CD4 $^{+}$ Т-клеточный был более сбалансированным (к gag – у 54 %, к env – у 67 % волонтеров). Через четыре недели и шесть месяцев после иммунизации у 60 % волонтеров показано наличие анти-gag и анти-env антител субкласса IgG. Нейтрализующие антитела определяли через один месяц после вакцинации. Ни одна из 24 IgA-проб не обладала ВИЧ-нейтрализующей активностью.

Определение антител к вирусу вакцины показало, что ко времени второй ВИЧ/MVA-иммунизации их титр не превышал фоновых значений. Пик антител в этом испытании отмечался через две недели после иммунизации и снижался к шести месяцам. Следовательно, предсуществующий иммунитет к вирусу вакцины, штамм MVA, не снижал ВИЧ-индукцированный иммунный ответ, что свидетельствует о возможности повторного использования этого вируса как вектора [28].

Влияние цитокина ГМ-КСФ на индуцирование иммунного ответа также оценено в испытании, проведенном в четырех клинических центрах США [29]. Для праймирования применялась GEO-DO3 ДНК-вакцина, которая экспрессировала неинфекционные вирусоподобные частицы из клайда В и коэкспрессировала GM-CSF. Для бустирования применялась вакцина MVA/HIV62B, которая экспрессировала вирусоподобные частицы с тех же ВИЧ-последовательностей, что и праймирующая вакцина. И в этом испытании установлено, что коэкспрессия ГМ-КСФ не увеличивала иммунный ответ, поэтому в дальнейших испытаниях использовать этот цитокин не имеет смысла [29].

Усиление иммунного ответа при бустировании белковым компонентом оболочки ВИЧ. С целью исследования изменения уровня индуцируемого иммунного ответа, особенно гуморального, при добавлении во второе бустирование белкового компонента – делетированной субединицы оболочки Gp140 ВИЧ-1C с адьювантом MF59, проведено испытание I фазы в двух центрах Южно-Африканской Республики и в двух центрах США [30].

Для праймирования использовалась вакцина SAAVI DNA-C2, представленная двумя ДНК-плазмидами [31]. Используемая для бустирования вакцина SAAVI MVA-C экспрессировала все компоненты ДНК-вакцины. Gp140 ВИЧ-1C – это рекомбинантная олигомерная V2-делетированная gp140 вакцина (gp140 ΔV2.TV1), вводимая вместе с адьювантом MF59 (Gp140/MF59-вакцина). Волонтеры иммунизированы трижды ДНК-вакциной и дважды вакциной MVA-C. После этой вакцинации через два года 27 из них были рандомизированы выбраны для вакцинации вакциной Gp140/MF59 в дозе 100 мкг, введенной двукратно внутримышечно с интервалом в три месяца [30].

В результате первой иммунизации у 72 % волонтеров вырабатывался CD4 $^{+}$ Т-клеточный иммунный ответ, в основном к белку env, который выявлялся более двух лет после первого бустирования и усиливался при бустировании вакциной Gp140/MF59, определяясь при этом уже у 87 % волонтеров. Полифункциональный CD8 $^{+}$ Т-клеточный иммунный ответ выражен значительно меньше (у 32 % волонтеров) и направлен в основном против белка pol, в меньшей степени против белков env и gag.

После вакцинации ДНК/MVA-C выявлялся низкий уровень ВИЧ-1-специфических связывающих антител, который увеличивался после бустирования вакциной Gp140/MF59 и определялся у 100 % пациентов. Следовательно, второе бустирование белковым компонентом (вакциной Gp140/MF59) усиливало клеточный и гуморальный иммунные ответы [30].

Усиление иммунного ответа после вторично двукратного бустирования белковым препаратом CN54rgp140, введенным совместно с глюкопиранозил-липидным адьювантом (GLA-AF), также показано в испытании [32], проведенном в Танзании на 40 волонтерах, ранее иммунизированных ДНК- и MVA-вакцинами, экспрессирующими ВИЧ-антителы.

Поскольку выявлено, что бустирование, проведенное после длительного перерыва после последней вакцинации, обогащало клеточный и гуморальный иммунный ответы [28, 30, 32], было решено провести бустирование иммунизированных в испытании RISVAC02 волонтеров. В RISVAC02 испытании [33] I фазы, выполнявшемся на протяжении 2009 г. в Испании, участвовали 30 не инфицированных ВИЧ волонтеров с низким риском заражения. Из них 24 человека были иммунизированы трижды вакциной MVA-B в дозе $1 \cdot 10^8$ БОЕ, шестеро – плацебо. Вакцинация вызывала умеренный длительный ВИЧ-

специфический Т-клеточный ответ у 75 % волонтеров, а гуморальный иммунный ответ – у 95 % [33].

Через четыре года после последней вакцинации 13 человек из этих волонтеров, не инфицированных ВИЧ, бустированы четвертой дозой той же вакцины [34]. Испытание проводилось с сентября 2013 г. по декабрь 2014 г. в Испании. Иммунный статус волонтеров оценивался непосредственно перед испытанием, через 2, 4 и 12 недель после вакцинации [34].

После четырехлетнего перерыва только у небольшой части (12,5 %) участников этого испытания поддерживался специфический Т-клеточный ответ против ВИЧ-антител, а у 23,1 % волонтеров выявлялись env-специфические связывающие антитела, что свидетельствует о том, что три дозы вакцины MVA-B не индуцируют длительной Т-клеточной памяти против ВИЧ-инфекции.

Последнее бустирование значительно увеличивало скорость появления и количество антител, связывающихся с гликопротеином Gp120, у 92 % испытуемых волонтеров. Вектор-специфический Т-клеточный ответ бустирован у 80 % волонтеров, а ответ антител – у 100 %.

Следовательно, четвертое гомологичное бустирование вакциной MVA-B через четыре года после третьего введения индуцировало среднее повышение ВИЧ-специфического Т-клеточного ответа у 38 % волонтеров, но значительно увеличивало ответ нейтрализующих антител к ВИЧ-1 и MVA-вектору [34].

Применение MVA-вакцины у ВИЧ-инфицированного контингента. Необходимо отметить, что высокоактивная антиретровирусная терапия (АРТ) значительно улучшает клинические результаты у ВИЧ-инфицированных пациентов, обеспечивая супрессию вирусной репликации. Однако АРТ не в состоянии элиминировать вирус [35]. Несмотря на всю пользу ее применения, длительный режим использования приводит к лекарственной резистентности или токсичности. Кроме того, высокоактивная АРТ доступна не всем слоям населения. Эти причины вызывают необходимость получения терапевтических вакцин, которые смогут элиминировать персистирующий возбудитель и бустировать хозяйский иммунитет, чтобы контролировать вирусную репликацию при прерывании АРТ [36].

В испытании [37] авторы оценили количество, широту, полифункциональность и фенотипические профили ВИЧ-1-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточных иммунных ответов, вызываемых у хронически ВИЧ-инфицированных субъектов, получающих АРТ, до и после применения MVA-вакцины. Также была оценена возможность этого подхода индуцировать вектор-специфический Т-клеточный ответ, следующий за вакцинацией. Испытание проводилось в Испании в ноябре 2011 – декабре 2013 г. В нем участвовали хронически ВИЧ-инфицированные волонтеры, получающие АРТ, с количеством CD4⁺ около 450 клеток/мм³ и незначительной вирусемией

(<50 копий/мл). Волонтеры трижды вакцинированы вакциной MVA-B. АРТ прерывалась на восемь недель после последней вакцинации. Вакцина MVA-B экспрессировала мономерный гликопротеин Gp120 из ВИЧ-1-изолята BX08 как бесклеточный продукт и Gag-Pol-Nef (GPN) из ВИЧ-1-клона ПВ как внутриклеточный полипротеин 160 Kda.

Иммунизация MVA-B индуцировала значительные количества вновь определяемых ВИЧ-1-антителен-специфических CD4⁺ Т-клеток после двух или трех доз по сравнению с базовыми значениями. Число позитивных env-, gag- и GPN-специфических CD8⁺ Т-клеточных ответов не оказывало значительного влияния на результаты вакцинации. ВИЧ-1-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные ответы почти не изменились в группе плацебо. После иммунизации в группе вакцинированных наблюдалось повышение количества ВИЧ-1-специфических CD4⁺ Т-клеток на 64 % и CD8⁺ Т-клеток на 50 %, хотя статистические различия выявлены только для CD4⁺ Т-клеток. Перед вакцинацией количество и частота ВИЧ-1-специфических CD4⁺ Т-ответов в группе плацебо были значительно выше, чем в группе вакцинированных, но эти значения изменились после иммунизации, когда появились вновь образующиеся ВИЧ-специфические CD4⁺ Т-ответы, что свидетельствует о том, что повторная экспозиция с антигенами ВИЧ-1 увеличивает иммунный ответ. ВИЧ-1-специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы определялись у всех исследуемых волонтеров до и после вакцинации, и, хотя иммунизация индуцировала их повышение, эти отличия были незначительными [37].

Помимо ВИЧ-1-специфического иммунного ответа изучался иммунный ответ в отношении вируса вакцины, штамм MVA. До вакцинации ни один из волонтеров в обеих группах не имел антивекторного иммунитета. После двух или трех вакцинаций полифункциональный CD8⁺ антивекторный иммунный ответ определялся у 86 % вакцинированных. В группе плацебо этот иммунный ответ не выявлен.

Следовательно, ВИЧ-инфицированные волонтеры, получающие АРТ, при иммунизации вакциной MVA-B индуцируют иммунный ответ против ВИЧ и против рекомбинантного вируса вакцины, штамм MVA, причем вектор-специфический иммунный ответ не интерферирует с ВИЧ-специфическим [37].

Высокая антигенная вариабельность вирусов, служащая причиной хронических (СПИД и гепатит С) и активных (грипп и лихорадка денге) заболеваний, усложняет создание эффективных вакцин. Вакцины против подобных вариабельных вирусов должны индуцировать адаптивный иммунный ответ, нацеленный на все уязвимые области, чтобы предотвратить инфекцию или облегчить иммунный контроль вирусной репликации для предотвращения прогрессирования заболевания [38]. Все вирусные протеомы, даже самые вариабельные, содержат консервативные области, которые при функциональном давлении на них ограничивают вариабельность.

Создание вакцин, сфокусированное на узнавании подобных консервативных областей, может быть хорошей доступной стратегией для улучшения эффективности вакцин против заболеваний, вызываемых вариабельными патогенами [39].

Поэтому оценивалась возможность использования вакцины MVA·HIVconsv на хронически инфицированных волонтерах с содержанием ВИЧ РНК <50 копий/мл, количеством CD4⁺ Т-клеток >350 клеток/мкл, получающих антиретровирусную терапию. Испытание проводилось в Великобритании [40]. Вакцина MVA·HIVconsv содержала гены 14 высококонсервативных областей вирусной протеомы, экспрессирующих химерный иммуноген. Ранее была показана иммуногенность этой вакцины на мышах и обезьянах [41]. Вакцину вводили на 1, 28 и 84-е сутки. У всех пациентов содержание РНК ВИЧ оставалось на уровне <50 копий/мл, а количество CD4⁺ Т-клеток – на уровне до иммунизации.

Оценка Т-клеточного иммунного ответа показала, что если довакцинальный иммунный ответ к ВИЧ выявлялся у 16 из 19 волонтеров, то после иммунизации он был определен у всех волонтеров иммунизированной группы. Пик ответа не был синхронизирован и отмечался между 14 и 56-ми сутками, что характерно и для волонтеров группы плацебо. В целом статистически достоверных различий между показателями проб волонтеров всех групп не обнаружено. Основное отличие в клеточном иммунном ответе обусловлено количеством CD8⁺ Т-клеток, которое значительно увеличилось после вакцинации, что свидетельствует о бустировании предсуществующего иммунитета вакциной MVA·HIVconsv. Не найдено значительных различий в количестве или в фенотипе CD8⁺ Т-клеток среди пациентов всех групп. Для CD4⁺ Т-клеток отмечено большее количество полифункциональных клеток в пробах волонтеров, получивших высокую иммунизирующую дозу. Определение общей ВИЧ-1 ДНК и остаточной виремии не выявило различий между показателями до и после вакцинации. Активация Т-клеточного ответа иммунной системы организма на консервативные эпитопы вакцины сопровождалась повышением уровня IFN-γ. В целом подобная схема иммунизации показала достаточно скромные результаты в индуцировании иммунного ответа и уменьшении остаточной виремии [40], поэтому авторы предлагают использование гетерологичной прайм/бустерной иммунизации [39].

Таким образом, проведенные клинические испытания установили, что рекомбинантный штамм MVA, примененный в качестве бустерного вектора при гетерологичной прайм/бустерной схеме иммунизации, способен индуцировать клеточный и гуморальный иммунные ответы. Для праймирования применялись в основном ДНК-вакцины, что обусловлено их безопасностью. При иммунизации инфицированных ВИЧ волонтеров, получающих АРТ, примененные схемы вакцинации бустируют

уже существующий постинфекционный иммунитет. Однако данных об уровне индуцированного иммунного ответа для профилактики риска возможного заражения ВИЧ пока недостаточно.

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

Список литературы / References

1. Capucci S., Wee E.G., Schiffner T., LaBranche C.C., Bortwick N., Cupo A., Dodd J., Dean H., Sattentau Q., Montefiori D., Klasse P.J., Sanders R.W., Moore J.P., Hanke T. HIV-1-neutralizing antibody induced by simian adenovirus- and poxvirus MVA-vectored BG505 native-like envelope trimers. *PLoS One.* 2017; 12(8):e0181886. DOI: 10.1371/journal.pone.0181886.
2. Rompkey K.K.A., Abel K., Earl P., Kozlowski P.A., Easlick J., Moore J., Buonocore-Buzzelli L., Schmidt K.A., Willson R.L., Simon I., Moss B., Rose J., Marthas M.L. Immunogenicity of viral vector, prime-boost vaccine regimens in infant rhesus macaques: attenuated vesicular stomatitis virus (VSV) and modified vaccinia Ankara (MVA) recombinant SIV vaccines compared to live-attenuated SIV. *Vaccine.* 2010; 28(6):1481–92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.11.061.
3. Knudsen M.L., Ljungberg K., Tatoud R., Weber J., Esteban M., Liljestrom P. Alphavirus replicon DNA expressing HIV antigens is an excellent prime for boosting with recombinant modified vaccinia Ankara (MVA) or with HIV gp140 protein antigen. *PLoS One.* 2015; 10(2):e0117042. DOI: 10.1371/journal.pone.0117042.
4. Hopkins R., Bridgeman A., Joseph J., Gilbert S.C., McShane H., Hanke T. Dual neonate vaccine platform against HIV-1 and *M. tuberculosis*. *PLoS One.* 2011; 6(5):e20067. DOI: 10.1371/journal.pone.0020067.
5. Saubli N., Gea-Mallorqui E., Ferrer P., Hurtado C., Sanchez-Ortega S., Eto Y., Gatell J., Hanke T., Joseph J. Engineering new mycobacterial vaccine design for HIV-1B pediatric vaccine vectored by lysine auxotroph of BCG. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2014; 1:14017. DOI: 10.1038/mtdm.2014.17.
6. Buchbinder S.P., Mehrotra D.V., Duerr A., Fitzgerald D.W., Mogg R., Li D., Gilbert P.B., Lama J.R., Marmor M., Del Rio C., McElrath M.J., Casimiro D.R., Gottesdiner K.M., Chodakewitz J.A., Corey L., Robertson M.N. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the StepStudy): a double-blind, randomized, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet.* 2008; 372:1881–93. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61591-3.
7. Gray G.E., Allen M., Moodie Z., Churchyard G., Bekker L.G., Nchabeleng M., Mlisana K., Metch B., de Bruyn G., Latka M.H., Roux S., Mathebula M., Naicker N., Ducar C., Carter D.K., Puren A., Eaton N., McElrath M.J., Robertson M., Corey L., Kublin J.G. Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomized, placebo-controlled, test-of-concept phase 2b study. *Lancet Infect. Dis.* 2011; 11(7):507–15. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70098-6.
8. Rerkhs-Ngarm S., Pititsutthithum P., Nitayaphan S., Kaewkungwal J., Chiu J., Paris R., Premrion N., Namwat C., de Souza M., Adams E., Benenson M., Gurunathan S., Tartaglia J., McNeil J.G., Francis D.P., Stablein D., Birx D.L., Chunsuttiwat S., Khamboonruang C., Thongcharoen P., Robb M.L., Michael N.L., Kunasol P., Kim J.H. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361(23):2209–20. DOI: 10.1056/NEJMoa0908492.
9. Machett M., Smith G.L., Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1982; 79(23):7415–9. DOI: 10.1073/pnas.79.23.7415.
10. Redfield R.R., Wright D.C., James W.D., Jones T.S., Brown C., Burke D.S. Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316(11):673–6. DOI: 10.1056/NEJM198703123161106.
11. Greenberg R.N., Overton E.T., Haas D.W., Frank I., Goldman M., von Krempelhuber A., Virgin G., Bädeker N., Vollmar J., Chaplin P. Safety, immunogenicity, and surrogate markers of clinical efficacy for modified vaccinia Ankara as a smallpox vaccine in HIV-infected subjects. *J. Infect. Dis.* 2013; 207:749–58. DOI: 10.1093/infdis/jis753.
12. Mair A., Stickl H., Muller H.K., Danner K., Singer H. The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl). *Zentralbl. Bakteriol.* B. 1978; 167(5–6):375–90.
13. Pavel'ev D.I., Stovba L.F., Pistsov M.N., Lebedev V.N., Borisevich S.V. The using of recombinant attenuated strain MVA of vaccinia virus as a vector vaccine against tuberculosis. *Bakteriologiya. [Bacteriology].* 2018; 3(2):43–50. [Павельев Д.И., Столова Л.Ф., Писцов М.Н., Лебедев В.Н., Борисевич С.В.]

- Применение рекомбинантного аттенуированного штамма MVA вируса вакцины в качестве векторной вакцины для иммунизации против туберкулеза. *Бактериология*. 2018; 3(2):43–50]. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-43-50.
14. Zitzmann-Roth E.M., von Sonnenburg F., de la Motte S., Arndtz-Wiedemann N., von Krempelhuber A., Uebler N., Vollmar J., Virgin G., Chaplin P. Cardiac safety of modified vaccinia Ankara for vaccination against smallpox in a young, healthy study population. *PLoS One*. 2015; 10(4):e122653. DOI: 10.1371/journal.pone.0122653.
 15. Stovba L.F., Krotkov V.T., Pavel'ev D.I., Mel'nikov S.A., Lebedev V.N., Borisovich S.V. Analysis and Prospects of Using Recombinant Vaccinia Virus MVA Strain as a vector in the development of the vaccines against human and simian immunodeficiency virus diseases. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 2:37–44. [Стовба Л.Ф., Кротков В.Т., Павельев Д.И., Мельников С.А., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Анализ и перспективы применения рекомбинантного вируса вакцины, штамм MVA, в качестве вектора при разработке вакцин против заболеваний, вызванных вирусами иммунодефицита человека и обезьянь. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 2:37–44]. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-37-44.
 16. Melamed S., Israely T., Paran N. Challenges and achievements in prevention and treatment of Smallpox. *Vaccines (Basel)*. 2018; 6(1):8. DOI: 10.3390/vaccines6010008.
 17. Keefer M.C., Frey S.E., Elizaga M.L., Metch B., De Rosa S.C., Barroso P.F., Tomaras G.D., Cardinali M., Goepfert P.A., Kalichman A., Phiippion V., McElrath M.J., Jin X., Ferrari G., Defave O.D., Mazzara G.P., Montefiori D., Pensiero M., Panicali D.L., Corey L. A phase 1 trial of preventive HIV vaccination with heterologous poxviral-vectors containing matching HIV-1 inserts in healthy HIV-uninfected subjects. *Vaccine*. 2011; 29(10):1948–58. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.12.104.
 18. Walsh S.R., Seaman M.S., Grandpre L.E., Charbonneau C., Yanosick K.E., Metch B., Keefer M.C., Dolin R., Baden L.R. Impact of anti-orthopoxvirus neutralizing antibodies induced by heterologous prime-boost HIV-1 vaccine on insert-specific immune responses. *Vaccine*. 2012; 31(1):114–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.10.093.
 19. Gorse M.J., Newman A., deCamp Á., Hay C.M., De Rosa S.C., Noonan E., Livingston B.D., Fuchs J.D., Kalams S.A., Cassini-Ghavami F.L. DNA and modified vaccinia virus Ankara encoding multiple cytotoxic and helper T-lymphocyte epitopes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) are safe but weakly immunogenic in HIV-1-uninfected vaccinia virus-naïve adults. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(5):649–58. DOI: 10.1128/CVI.00038-12.
 20. Gangadhara S., Kwon Y.-M., Jeeva S., Quan F.-S., Wang B., Moss B., Compans R.W., Amara R.R., Jabbar M.A., Kang S.-M. Vaccination with combination DNA and virus-like particles enhances humoral and cellular immune responses upon boost with recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing human immunodeficiency virus envelope proteins. *Vaccines (Basel)*. 2017; 5(4):52. DOI: 10.3390/vaccines5040052.
 21. Mehendale S., Thakar M., Sahay S., Kumar M., Shete A., Sathyamurthy P., Verma A., Kurle S., Shrotri F., Gilmour J., Goyal R., Dally L., Sayeed E., Zachariah D., Ackland J., Kochhar S., Cox J.H., Excler J.-L., Kumaraswami V., Paranjape R., Ramanaathan V.D. Safety and immunogenicity of DNA and MVA HIV-1 subtype C vaccine prime-boost regimens: A phase I randomised trial in HIV-uninfected Indian volunteers. *PLoS One*. 2013; 8(2):e55831. DOI: 10.1371/journal.pone.0055831.
 22. Goepfert P.A., Elizaga M.L., Seaton K., Tomaras G.D., Montefiori D.C., Sato A., Hural J., De Rosa S.C., Kalams S.A., McElrath M.J., Keefer M.C., Baden L.R., Lama J.R., Sanchez J., Mulligan M.J., Buchbinder S.P., Hammer S.M., Kobrin B.A., Pensiero M., Butler C., Moss B., Robinson H.L. Specificity and 6-month durability of immune responses induced by DNA and recombinant modified vaccinia Ankara vaccines expressing HIV-1 virus-like particles. *J. Infect. Dis.* 2014; 210(1):99–110. DOI: 10.1093/infdis/jiu003.
 23. Smith J.M., Amara R.R., Campbell D., Xu Y., Patel M., Sharma S., Butera S.T., Ellenberger D.L., Yi H., Chennareddi L., Herndon J.G., Wyatt L.S., Montefiori D., Moss B., McClure H.M., Robinson H.L. DNA/MVA vaccine for HIV type I: effects of codon-optimization and expression of aggregates or virus-like particles on immunogenicity of the DNA prime. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2004; 20(12):1335–47. DOI: 10.1089/aid.2004.20.1335.
 24. Goepfert P.A., Elizaga M.L., Sato A., Qin L., Cardinali M., Hay C.M., Hural J., DeRosa S.C., DeFawne O.D., Tomaras G.D., Montefiori D.C., Xu Y., Lai L., Kalams S.A., Baden L.R., Frey S.E., Blattner W.A., Wyatt L.S., Moss B., Robinson H.L. Phase 1 safety and immunogenicity testing of DNA and recombinant modified vaccinia Ankara vaccines expressing HIV-1 virus-like particles. *J. Infect. Dis.* 2011; 203:610–9. DOI: 10.1093/infdis/jiq105.
 25. Raska M., Czernekova L., Moldoveanu Z., Zachova K., Elliot M.C., Novak Z., Hall S., Hoelscher M., Maboko L., Brown R., Smith P.D., Mesteky J., Novak J. Differential glycosylation of envelope gp120 is associated with differential recognition of HIV-1 by virus-specific antibodies and cell infection. *AIDS Res. Ther.* 2014; 11:23. DOI: 10.1186/1742-6405-11-23.
 26. Bauer A., Podola L., Mann P., Missanga M., Haule A., Sudi L., Nilsson C., Kaluwa B., Lueer C., Mwakatima M., Munseri P.J., Maboko L., Robb M.L., Tovanabutra S., Kijak G., Marovich M., McCormack S., Joseph S., Lyamuya E., Wahren B., Sandström E., Biberfeld G., Hoelscher M., Bakari M., Kroidl A., Geldmacher C. Preferential targeting of conserved Gag region after action with heterologous DNA-prime-modified vaccinia virus Ankara-boost HIV vaccine regimen. *J. Virol.* 2017; 91(18):e00730–17. DOI: 10.1128/JVI.00730-17.
 27. Sandström E., Nilsson C., Hejdeman B., Bråve A., Bratt G., Robb M., Cox J., Vancott T., Marovich M., Stout R., Aboud S., Bakari M., Pallangyo K., Ljungberg K., Moss B., Earl P., Michael N., Birx D., Mhalu F., Wahren B., Biberfeld G. Broad immunogenicity of a multigene, multiclade HIV-1 DNA vaccine boosted with heterologous HIV-1 recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(10):1482–90. DOI: 10.1086/592507.
 28. Nilsson C., Godoy-Ramirez K., Hejdeman B., Bråve A., Gudmundsdotter L., Hallengård D., Currier J.R., Wiekzorek L., Hasselrod K., Earl P.L., Polonis V.R., Marovich M.A., Robb M.L., Sandström E., Wahren B., Biberfeld G. Broad and potent cellular and humoral immune responses after a second late HIV-modified vaccinia virus Ankara vaccination in HIV-DNA-primed and HIV-modified vaccinia virus Ankara-boosted Swedish vaccinees. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30(3):299–311. DOI: 10.1089/AID.2013.0149.
 29. Buchbinder S.P., Grunenberg N.A., Sanchez B.J., Seaton K.E., Ferrari G., Moody M.A., Frahm N., Montefiori D.C., Hay C.M., Goepfert P.A., Baden L.R., Robinson H.L., Yu X., Gilbert P.B., McElrath M.J., Huang Y., Tomaras G.D. Immunogenicity of a novel clade B HIV-1 vaccine combination: Results of phase 1 randomized placebo controlled trial of an HIV-1 GM-CSF-expressing DNA prime with a modified vaccinia Ankara vaccine boost in healthy HIV-1 uninfected adults. *PLoS One*. 2017; 12(7):e0179597. DOI: 10.1371/journal.pone.0179597.
 30. Gray G.E., Mayer K.H., Elizaga M.L., Bekker L.-G., Allen M., Morris L., Montefiori D., De Rosa S.C., Sato A., Gu N., Tomaras G.D., Tucker T., Barnett S.W., Mkhize N.N., Shen X., Downing K., Williamson C., Pensiero M., Corey L., Williamson A.-I. Subtype C Gp 140 vaccine boosts immune responses primed by the South African AIDS vaccine initiative DNA-C2 and MVA-C HIV vaccines after more than a 2-year gap. *Clin. Vaccine Immun.* 2016; 23(6):495–506. DOI: 10.1128/CVIM.00717-15.
 31. Burgers W.A., van Harmelen J.H., Shephard E., Adams C., Mgwebi T., Bourn W., Hanke T., Williamson A.L., Williamson C. Design and preclinical evaluation of a multigene human immunodeficiency virus type 1 subtype C DNA vaccine for clinical trial. *J. Gen. Virol.* 2006; 87(Pt 2):399–410. DOI: 10.1099/vir.0.81379-0.
 32. Joachim A., Bauer A., Joseph S., Geldmacher C., Munseri P.J., Aboud S., Missanga M., Mann P., Wahren B., Ferrari G., Polonis V.R., Robb M.L., Weber J., Tatoud R., Maboko L., Hoelscher M., Lyamuya E.F., Biberfeld G., Sandström E., Kroidl A., Bakari M., Nilsson C., McCormick S. Boosting with subtype C CN54rgp140 protein adjuvanted with glucopyranosyl lipid adjuvant after priming with HIV-DNA and HIV-MVA is safe and enhances immune responses: A phase I trial. *PLoS One*. 2016; 11(5):e0155702. DOI: 10.1371/journal.pone.0155702.
 33. García F., Bernaldo de Quirós J.C., Gómez C.E., Perdigero B., Nájera J.L., Jiménez V., García-Arriaza J., Guardo A.C., Pérez I., Díaz-Brito V., Conde M.S., González N., Alvarez A., Alcamí J., Jiménez J.L., Pich J., Arnaiz J.A., Maleno M.J., León A., Muñoz-Fernández M.A., Liljeström P., Weber J., Pantaleo G., Gatell J.M., Plana M., Esteban M. Safety and immunogenicity of a modified pox vector-based HIV/AIDS vaccine candidate expressing Env, Gag, Pol and Nef proteins of HIV-1 subtype B (MVA-B) in healthy HIV-1-uninfected volunteers: A phase I clinical trial (RISVAC02). *Vaccine*. 2011; 29(46):8309–16. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.098.
 34. Guardo A.S., Gómez C.E., Díaz-Brito V., Pich J., Arnaiz J.A., Perdigero B., García-Arriaza J., González N., Sorzano C.O.S., Jiménez L., Jiménez J.L., Muñoz-Fernández M.A., Gatell J.M., Alcamí J., Esteban M., López Bernaldo de Quirós J.C., García F., Plana M. Safety and vaccine-induced HIV-1 immune responses in healthy volunteers following a late MVA-B boost 4 years after the last immunization. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0186602. DOI: 10.1371/journal.pone.0186602.
 35. Sahu G.K. Potential implication of residual viremia in patients on effective antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2015; 31(1):25–35. DOI: 10.1089/AID.2014.0194.
 36. Hachimoto C., Tanaka T., Narumi T., Nomura W., Tamamura H. The successes and failures of HIV drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 2011; 6(10):1067–90. DOI: 10.1517/17460441.2011.611129.
 37. Gomez C.E., Perdigero B., García-Arriaza J., Cepeda V., Sánchez-Sorzano C.O., Mothe B., Jiménez J.L., Muñoz-Fernández M.A., Gatell J.M., López Bernaldo de Quirós J.C., Brander C., García F., Esteban M. A phase I randomized therapeutic MVA-B vaccination improves the magnitude and quality of the T cell immune

- responses in HIV-1-infected subjects on HAART. *PLoS One.* 2015; 10(11):e0141456. DOI: 10.1371/journal.pone.0141456.
38. Hanke T. Conserved immunogens in prime-boost strategies for the next-generation HIV-1 vaccines. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2014; 14(5):601–16. DOI: 10.1517/14712598.2014.885946.
39. Rosario M., Bridgeman A., Quakkelaar E.D., Quigley M.F., Hill B.J., Knudsen M.L., Ammendola V., Ljungberg K., Borthwick N., Im E.J., McMichael A.J., Drijfhout J.W., Greenaway H.Y., Venturi V., Douek D.C., Colloca S., Liljeström P., Nicosia A., Price D.A., Melief C.J., Hanke T. Long peptides induce polyfunctional T-cell against conserved regions of HIV-1 with superior breadth to single-gene vaccines in macaques. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40(7):1973–84. DOI: 10.1002/eli.20104034.
40. Hancock G., Morón-López S., Kopycinski J., Puertas M.C., Giannoulatou E., Rose A., Salgado M., Hayton E.J., Crook A., Morgan C., Angus B., Chen F., Yang H., Martinez-Picado J., Hanke T., Dorrell L. Evaluation of the immunogenicity and impact on the latent HIV-1 reservoir of a conserved region vaccine, MVA-HIVconsy, in antiretroviral therapy-treated subjects. *J. Int. AIDS Soc.* 2017; 20(1):21171. DOI: 10.7448/IAS.20.1.21171.
41. Borthwick N., Ahmed T., Ondondo B., Hayes P., Rose A., Ebrahimsa U., Hayton E.-J., Black A., Bridgemann A., Rosario M., Hill A.V.S., Berrie J., Moule S., Frahm N., Cox J., Colloca S., Nicosia A., Gilmour J., McMichael A.J., Dorrell L., Hanke T. Vaccine-elicited human T-cell recognizing conserved protein regions inhibit HIV-1. *Mol. Ther.* 2014; 22(2):464–75. DOI: 10.1038/mt.2013.248.

Authors:

Stovba L.F., Krotkov V.T., Mel'nikov S.A., Pavel'ev D.I., Lebedev V.N., Borisevich S.V. 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. 11, Oktyabrskaya St., Sergiev Possad-6, Moscow region, Russian Federation, 141306.

Об авторах:

Стовба Л.Ф., Кротков В.Т., Мельников С.А., Павельев Д.И., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. 48 Центральный научно-исследовательский институт. Российская Федерация, 141306, Московская область, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11.

DOI 10.21055/0370-1069-2021-3-23-32

УДК 616.98:579.852.11

В.С. Тимофеев, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Ю.О. Гончарова, И.А. Дятлов**ПУТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ В ПРИРОДНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ***ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск, Российской Федерации*

Сибирская язва – особо опасный зооантропоноз, вызываемый грамположительной спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Это заболевание поражает преимущественно копытных травоядных животных, в том числе использующихся в сельском хозяйстве, но может встречаться у других животных и человека. Именно сибириязвенной инфекции человека и сельскохозяйственных животных посвящено большинство исследований. В то же время вопросы эпидемиологии сибирской язвы в природных экосистемах освещены в литературе недостаточно подробно и зачастую весьма фрагментарно. В данном обзоре проведен анализ литературных источников, описывающих основные пути и способы распространения различных клинических форм сибириязвенной инфекции в природе, в первую очередь среди диких животных. В том числе мы касаемся некоторых неочевидных аспектов алиментарного заражения сибирской язвой, например, объясняющих разницу в чувствительности к заражению травоядных и хищных млекопитающих и даже разных половозрастных групп в пределах одного вида.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, сибирская язва, дикие животные, эпидемиология.

Корреспондирующий автор: Тимофеев Виталий Сергеевич, e-mail: timofeev_vitalii@mail.ru.

Для цитирования: Тимофеев В.С., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Гончарова Ю.О., Дятлов И.А. Пути распространения сибирской язвы в природных экосистемах. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 3:23–32. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-23-32.

Поступила 02.06.2021. Отправлена на доработку 07.07.2021. Принята к публ. 29.07.2021.

V.S. Timofeev, I.V. Bakhteeva, G.M. Titareva, Yu.O. Goncharova, I.A. Dyatlov**Routes of Spread of Anthrax in Natural Ecosystems***State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation*

Abstract. Anthrax is a particularly dangerous zoonosis caused by the Gram-positive spore-forming bacterium *Bacillus anthracis*. This disease mainly affects hoofed herbivores, including those used in agriculture, but can occur in other animals and in humans. That is why the majority of studies of this infection are focused on anthrax in humans and farm animals, as the most important issues from a practical point of view. At the same time, the issues of anthrax epidemiology in natural ecosystems are described in the literature in insufficient detail and often very fragmentary. This paper provides a review of the literature describing the main pathways, patterns and risks of the spread of various clinical forms of anthrax infection in nature, primarily among wild animals. Among other things, we cover some non-notable aspects of intestinal infection with anthrax which, for instance, explain the difference in sensitivity to infection in herbivorous and carnivorous mammals and even different sex and age groups within the same species.

Key words: *Bacillus anthracis*, anthrax, wild animals, epidemiology.

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

Corresponding author: Vitalii S. Timofeev, e-mail: timofeev_vitalii@mail.ru.

Citation: Timofeev V.S., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Dyatlov I.A. Routes of Spread of Anthrax in Natural Ecosystems. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:23–32. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-23-32.

Received 02.06.2021. Revised 07.07.2021. Accepted 29.07.2021.

Timofeev V.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9501-1380>

Bakhteeva I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6897-3613>

Titareva G.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9478-5563>

Goncharova I.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1682-8788>

Dyatlov I.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1078-4585>

Сибирская язва – особо опасное заболевание животных и человека, вызываемое грамположительной спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Главным образом оно поражает копытных млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных, но может поражать и других теплокровных, в том числе и человека. Патогенность *B. anthracis* обеспечивается наличием двух плазмид – рXO1 и рXO2, несущих генетические детерминанты основных факторов патогенности – сибириязвенных токсинов (летального и отечного), и капсулы, защищающие патоген от воздействия иммунной

системы хозяина [1–4]. Ключевой для эпидемиологии сибирской язвы характеристикой *B. anthracis* является способность к формированию эндоспор, крайне устойчивых в окружающей среде [5, 6]. Попадая в организм теплокровного хозяина, споры прорастают и превращаются в вегетативные клетки, которые размножаются в точке проникновения или в ближайших лимфатических тканях. Затем, если болезнь переходит в следующую стадию, они распространяются по организму лимфогематогенным путем и вызывают геморрагические некротические поражения, токсемию и сепсис, которые могут при-

вести к смерти. После этого вегетативные клетки, оставшиеся в трупе хозяина, погибают при его разложении под действием гнилостной микрофлоры. Но часть из них попадает в почву с кровянистыми выделениями на последних стадиях инфекции и при поедании трупа хищниками и падальщиками. Часть попавших в почву вегетативных клеток *B. anthracis* образует споры. Таким образом жизненный цикл патогена замыкается, а вновь образованные споры способны вызвать новый цикл заражения. При этом они сохраняют жизнеспособность и, что более важно, вирулентность в течение как минимум десятков и даже сотен лет. Место гибели животного от сибирской язвы сохраняет эпидемический потенциал, то есть на нем возможны новые вспышки заболевания [7, 8].

По некоторым оценкам, вплоть до новейшего времени сибирская язва была одной из основных причин неконтролируемой смертности домашнего скота – коров, овец, коз, лошадей и свиней по всему миру [9]. Лишь развитие медицинского и ветеринарного надзора в XIX – начале XX в. и затем внедрение в практику вакцинопрофилактики и антибиотикотерапии позволили свести количество случаев заболевания сибирской язвой в развитых странах к минимуму [10]. Но если в развитых странах сибирская язва практически победжена, то в бедных и слаборазвитых регионах Африки, Центральной и Южной Азии это заболевание остается достаточно актуальным. Ежегодная заболеваемость сибирской язвой колеблется от 20 тыс. до 100 тыс. человек [11, 12], а непосредственно группа риска насчитывает 63,8 млн человек и 1,1 млрд голов скота [13]. Это приводит к риску заноса инфекции из неблагополучных районов в благополучные вместе с контамированными *B. anthracis* товарами (мясо, шерсть, шкуры, костная мука и другие продукты животного происхождения) или зараженным скотом. Кроме того, и сейчас сохраняется возможность вспышек сибирской язвы в благополучных регионах при активизации старых либо ранее неизвестных почвенных очагов [7], а также существует угроза использования *B. anthracis* как биологического оружия [14]. Это обуславливает необходимость постоянного контроля этой инфекции и ее изучения. Большинство исследований сфокусированы на сибирской язве у сельскохозяйственных животных и у человека, в то время как аспекты сибиреязвенной инфекции, касающиеся ее существования в природе и различной чувствительности к ней у разных видов животных, представлены в литературных источниках в основном в виде фрагментарных наблюдений. В данном обзоре мы поставили перед собой цель: попытаться собрать воедино и обобщить результаты этих многочисленных, но разрозненных исследований.

Пути и способы распространения сибирской язвы в природе. Заболевание сибирской язвой может протекать в разных формах с различными симптомо-

комплексами, тяжестью и летальностью. Наименее тяжелая кожная форма возникает при попадании спор *B. anthracis* в открытые повреждения кожи, где они прорастают и развиваются, приводя к местным некротическим поражениям [15]. Легочная форма возникает в результате вдыхания аэрозольных частиц диаметром от 1 до 5 мкм, содержащих споры *B. anthracis* (более крупные частицы удаляются с помощью мукоцилиарного клиренса легких). Эти споры захватываются альвеолярными фагоцитами и дендритными клетками, транспортируются в трахеобронхиальные и средостенные лимфатические узлы, где и прорастают. Без ранней терапии эта форма инфекции приводит к отеку органов грудной полости, бактеремии, менингиту и 100 % летальности [15, 16]. Орофарингеальная (ротоглоточная) и гастроинтестинальная (желудочно-кишечная) формы связаны с употреблением контаминированной спорами *B. anthracis* пищи. Проявляются эти формы либо изъязвлением ротовой полости, лимфаденопатией шейных и/или подчелюстных лимфатических узлов и отеком шеи в случае орофарингеальной формы, либо язвенными поражениями и отеками желудка и кишечника в случае гастроинтестинальной формы. Обе формы могут приводить к тяжелой интоксикации, бактеремии и летальному исходу [15, 17]. Встречается также инъекционная форма сибирской язвы, возникающая при внутривенном введении препаратов, контаминированных спорами *B. anthracis*, описанная у инъекционных опиатных наркоманов. Она проявляется локальными поражениями мягких тканей с выраженным отеком и/или тяжелой системной сибирской язвой с полиорганной недостаточностью и сибиреязвенным менингитом [18]. Однако из-за крайне специфического способа передачи инфекции эта форма болезни является редкой и не значима для эпидемиологии.

Для развития конкретной формы инфекции первостепенное значение имеют входные ворота инфекции, то есть путь ее передачи, который реализуется в зависимости от определенной комбинации биогенных и абиогенных факторов окружающей среды и физиологических, иммунологических и этологических особенностей конкретного хозяина. Ниже мы рассматриваем некоторые особенности основных путей передачи сибирской язвы.

Алиментарный путь заражения. Это основной способ распространения сибирской язвы среди животных в сельском хозяйстве и дикой природе, так как именно благодаря трофической цепи «растения – травоядные – хищники/падальщики» осуществляется жизненный цикл *B. anthracis* и его циркуляция в природе.

Первый этап инфекционного процесса – заражение травоядных. Наиболее интересными для изучения в этом процессе являются моменты, в первую очередь касающиеся динамики жизнеспособности спор *B. anthracis* в почве, взаимодействия спор с почвенной микрофлорой и ризосферой растений и

их герминации. В конечном итоге от этого зависят дозы патогена, воздействию которых будет подвергаться восприимчивое животное. Резюмируя опубликованные наблюдения, можно привести некоторые факты, важные для распространения сибирской язвы алиментарным путем.

На месте гибели животного от сибирской язвы (или поедания хищниками животного с сибиреязвенной бактерией) достаточная для заражения концентрация спор сохраняется на вегетативных частях растений в течение двух лет [19, 20]. При этом разлагающиеся останки удобряют почву, что усиливает рост растений, а кроме того, само по себе присутствие в почве *B. anthracis* дополнительно стимулирует прорастание семян трав [21]. Благодаря этому в течение одной-трех вегетаций в месте разложения останков животного, болевшего сибирской язвой, стимулируется рост травы, которая вырастает более высокой и сочной, чем окружающая растительность, и выглядит более привлекательной для травоядных. Одновременно это место сохраняет свою эпидемическую опасность. Эти два фактора в совокупности повышают вероятность нового цикла заражения травоядных и способствуют циркуляции заболевания в популяции.

Кроме того, для травоядных зачастую характерны сезонные миграции, которые носят не случайный характер, а проходят по более-менее постоянным маршрутам [22]. Таким образом, место гибели животного от сибирской язвы не только сохраняет повышенный эпидемический потенциал в течение нескольких сезонов, но и с большой долей вероятности за это время посещается восприимчивыми животными. Этим не только поддерживается циркуляция сибирской язвы в экосистеме, но и обеспечивается определенная сезонность возникновения вспышек. Примечательно, что сезонные циклические миграции характерны не только для диких животных. Кочевое животноводство и перегоны скота по скотопрогонным трассам, которые до сих пор практикуются в некоторых регионах, также обладают сезонной цикличностью. При недостаточно эффективных противоэпидемических мероприятиях (вакцинация, дезобработка мест падежа скота и т.д.) создаются идеальные условия для вспышек сибирской язвы. Например, по некоторым оценкам, в США в период до 1930-х гг. вероятность заражения скота сибирской язвой в пределах 10 км от скотопрогонных трасс достигала 1:3,99 ($p<0,0003$), а в некоторых регионах даже 1:0,60 ($p<0,4175$) [9], то есть значительная часть травянистой растительности поблизости скотопрогонных трасс оказалась контаминированной спорами *B. anthracis* в концентрации, достаточной для заражения.

Сезонные миграции в совокупности с выживанием спор на поверхности растений и стимуляцией роста растительности на месте разложения погибшего животного не являются единственным механизмом, обеспечивающим сезонность вспышек сибирской

язвы. Определенную роль играет сезонность осадков: в сезон дождей травоядные съедают больше грунта, налипшего на растения, что также может увеличивать их заболеваемость сибирской язвой [23]. Также заболеваемость может расти и в сезон засухи, когда животные вынуждены есть сухие растения и из-за недостатка корма увеличивать в рационе долю приземных частей растений, которые жестче более высоко расположенных частей и больше загрязнены песком. Колючая трава и песок приводят к микротравмам пищеварительного тракта, которые могут служить входными воротами инфекции [9, 24].

Как уже было отмечено, споры *B. anthracis* сохраняются на поверхности растений в достаточных для заражения концентрациях в течение не более чем одного-двух лет, но их сохранность в верхних слоях почвы заметно выше. Жизнеспособные споры могут быть обнаружены в верхних слоях в течение семи и более лет после разложения туши погибшего животного даже в регионах с жарким климатом и высокой инсоляцией [25], то есть в условиях, не способствующих сохранности микрофлоры. В более холодных регионах *B. anthracis* выживает в верхних слоях почвы, по-видимому, еще дольше. В итоге те травоядные, которые поедают больше приземной растительности, особенно вырывая ее вместе с корнями, подвергаются риску заражения более длительное время. Такими особенностями трофического поведения, как сравнительная доля в рационе приземных или высоко расположенных частей растений, высота, на которую объедается растение, и т.д., можно частично объяснить разную частоту заболевания сибирской язвой среди разных групп восприимчивых животных.

Еще один значимый вопрос, касающийся алиментарной сибирской язвы, – каковы же именно механизмы заражения? В понимании того, как проглощенная спора приводит к характерной клинической картине, есть определенные пробелы. В первую очередь это касается самых начальных стадий инфекционного процесса: попадания споры в организм хозяина и прорастания в нем.

Дело в том, что по общепринятой модели эндоспоры *B. anthracis*, попадая в организм, поглощаются макрофагами, где они внутриклеточно прорастают в вегетативные клетки, покрытые капсулой [26]. Но *B. anthracis* – неинвазивный микроорганизм, и в нормальных условиях кожные покровы, слизистые оболочки ЖКТ и дыхательных органов создают эффективные барьеры, препятствующие проникновению спор *B. anthracis* в организм. Для развития инфекционного процесса споры должны фагоцитироваться либо в глубине поврежденной кожи, либо в регионарных лимфатических узлах, куда мигрируют споры, проникшие через повреждения покровов, либо легочными фагоцитами в альвеолах. При этом, соответственно, развиваются кожная и легочная формы сибирской язвы. Но как

попавшая в желудочно-кишечный тракт спора преодолевает эпителиальный барьер кишечника – до сих пор остается недостаточно ясным. Мы нашли в литературных источниках два взгляда на механизм этого процесса. Согласно первому из них, определенную роль в инфицировании играют микротравмы, наносимые твердыми включениями в пище, такими как песчинки, фрагменты лигнифицированных частей растений и т.д. [9, 24]. Через эти микротравмы проникают споры *B. anthracis*, после чего они фагоцитируются, прорастают в фагосоме, и начинается собственно инфекционный процесс [27]. Но при таком механизме заражения основной формой болезни должна быть орофарингеальная, а не интестинальная, так как в первую очередь травмируются выше расположенные отделы пищеварительной системы – ротовая полость и пищевод, что не согласуется с эпидемической картиной при вспышках среди травоядных. Кроме того, травмам пищеварительного тракта должны быть более подвержены именно хищники, которые ранятся осколками костей и другими твердыми частями тел поедаемых жертв, но которые, тем не менее, редко заболевают сибирской язвой, даже поедая зараженных ею животных. Поэтому более правдоподобным, на наш взгляд, выглядит другой механизм заражения гастроинтестинальной сибирской язвой – прорастание спор в просвете ЖКТ с последующим синтезом белков, повреждающих эпителий кишечника, таких как антролизин O, и проникновением через эти повреждения вегетативных инкапсулированных клеток, за которым следует быстрое развитие системной инфекции [28, 29]. Именно этот механизм заражения может объяснить, хотя бы отчасти, различную чувствительность к сибирской язве травоядных копытных и хищников. Ведь если рассмотреть основные физиолого-анатомические адаптации пищеварительной системы этих двух групп животных, то можно отметить следующее:

1. Травоядные адаптированы к пище, содержащей большое количество структурных полисахаридов растений, которые сложно поддаются ферментативному расщеплению и обеспечивают получение сравнительно небольшого количества энергии. Адаптация ЖКТ травоядных состоит в большом его объеме и длине относительно размеров тела, низкой скорости движения пищи по ЖКТ, относительно низкой протеолитической активности и наличием отделов желудка у жвачных (рубец) и кишечника у моногастрических травоядных, в которых проходит длительная ферментация пищи симбиотическими бактериями. Именно в этих отделах у травоядных соблюдается pH, приближенный к нейтральным значениям, что вместе с низкой протеолитической активностью и наличием питательных веществ (продуктов микробного гидролиза растительных полисахаридов) является предпосылкой для успешного прорастания спор.

Длительность нахождения в них каждой порции пищи предоставляет достаточно времени не только для ферментации полисахаридов, но и для герминации спор. Вегетативные клетки *B. anthracis* в этой модели инкапсулируются, повреждают кишечный эпителий секретируемыми белками и далее проникают в организм через эти повреждения [28, 29].

2. ЖКТ хищников, напротив, по сравнению с ЖКТ травоядных более короткий, менее объемный, пищеварение проходит быстрее и интенсивнее при высокой протеолитической активности и низких значениях pH в желудке. Многие всеядные животные, относительно устойчивые к сибирской язве (грызуны, свиньи), по упомянутым анатомо-физиологическим особенностям строения и функционирования ЖКТ хоть и отличаются от хищников, но все же находятся гораздо ближе к ним, чем к классическим травоядным. Скорее всего, ни сравнительно агрессивные условия среды, ни короткий временной интервал нахождения пищи в ЖКТ у хищников и всеядных не позволяют прорастать в нем спорам *B. anthracis*, инкапсулироваться вегетативным клеткам, повредить кишечный эпителий и проникнуть в организм.

При этом именно у хищников, падальщиков и всеядных сибирская язва часто протекает именно в виде локальных поражений ротовой полости и мягких тканей головы, без перехода инфекции в генерализованную форму [9, 30–32]. Протекание болезни именно по такому пути указывает на то, что заражение происходит при попадании *B. anthracis* в микротравмы, наносимые твердыми частями поедаемой туши, например осколками костей. А это, в свою очередь, означает, что хищники в принципе способны заразиться сибирской язвой, в том числе алиментарным путем, но только верхние отделы – ротовая полость и пищевод – уязвимы для инфекции при движении по пищеварительному тракту контаминированной *B. anthracis* пищи. У травоядных же, даже если и происходит заражение сибирской язвой через микротравмы ротовой полости, вызванные, например, твердыми частями поедаемых растений, наличие спор *B. anthracis* в этой пище приводит к развитию и желудочно-кишечной формы болезни, быстро убивающей животное еще до того, как успевают образоваться поражения ротовой полости, характерные для орофарингеальной сибирской язвы. В результате именно желудочно-кишечная форма инфекции оказывается наиболее эпидемически значимой для травоядных.

В литературе мы не обнаружили прямых экспериментальных подтверждений этой концепции. Но все же есть ряд работ, результаты которых косвенно свидетельствуют в ее пользу. Например, показано, что бациллярные споры могут прорастать в рубце жвачных животных [33], а вегетативные клетки *B. anthracis* способны разрушать кишечный эпителий [28, 29] и проникать через образованные повреждения в организм хозяина, вызывая

бактеремию [28]. Можно отметить два довольно интересных момента, описанных в последней процитированной работе. Первый касается технических моментов моделирования инфекции. Как видно из названия статьи «A new murine model for gastrointestinal anthrax infection», желудочно-кишечная форма инфекции моделировалась не на копытных, для которых она характерна, а на мышах. Но мыши относительно устойчивы к сибирской язве, в том числе к ее желудочно-кишечной форме. Для того чтобы вызвать заболевание, экспериментаторам пришлось провести ряд предварительных манипуляций перед заражением: длительное голодание для снижения активности пищеварительных ферментов в ЖКТ и нейтрализацию рН желудка раствором NaHCO_3 . Тем самым физиологические условия в ЖКТ подопытных мышей были в какой-то мере приближены к условиям в ЖКТ травоядных животных. И это служит дополнительным, хоть и косвенным, аргументом в пользу физиологических особенностей ЖКТ разных групп млекопитающих как одного из факторов избирательной чувствительности к желудочно-кишечной форме сибирской язвы. Второй момент, на котором можно остановиться, – после повреждения кишечного эпителия из просвета кишечника во внутреннюю среду организма хозяина проникал не только сибиризенный микроб, но и комменсальная кишечная микрофлора, которая высевалась из крови у трети животных, у которых развилась системная сибирская язва. Можно предположить, что подобные вторичные инфекции усугубляют состояние больного сибирской язвой животного и являются одним из механизмов повышенной тяжести и летальности желудочно-кишечной сибирской язвы.

Кроме того, прямым подтверждением тезиса о различной чувствительности к сибирской язве хищников и травоядных, как следствия физиолого-анатомических различий их ЖКТ, служит пониженная чувствительность к этой болезни разных половозрастных групп даже в рамках одного вида травоядных. Так, при вспышках сибирской язвы и среди домашнего скота [24, 34], и среди диких бизонов и лосей [35, 36], и даже среди хоботных (африканский слон) [37] было подмечено, что болезнь поражает преимущественно взрослых половозрелых самцов, доля заболевших самок гораздо меньше, а еще ниже процент зараженного молодняка.

Такое различие в чувствительности у половозрастных групп может быть обусловлено влиянием множества факторов – от особенностей питания до гормональных и поведенческих различий. В том числе определенную роль может играть половая сегрегация между самцами и самками одного вида по местам выпаса и пищевым предпочтениям [36]. Самцы многих копытных крупнее самок и, соответственно, съедают больше пищи, тем самым увеличивая риск алиментарного заражения. При этом самцы зачастую питаются более грубой растительностью, что увеличивает вероятность получения микротравм

верхних отделов пищеварительной системы, которые, по мнению некоторых авторов [9], могут сыграть роль входных ворот инфекции. Но, на наш взгляд, важнее то, что большая доля в рационе грубых частей растений увеличивает длительность пищеварения в первую очередь в рубце [36, 38, 39], что, с учетом обсуждаемой модели герминации спор *B. anthracis* как начальной стадии развития гастроинтестинальной сибирской язвы, также может повышать вероятность заболевания при питании контаминированной *B. anthracis* растительностью.

Но наиболее интересна низкая восприимчивость к сибирской язве у детенышей [9]. Этот феномен очень ярко подчеркивает роль особенностей строения и функционирования ЖКТ в эпидемиологии сибирской язвы. Во-первых, детеныши питаются молоком, что очевидно снижает риск заражения спорами *B. anthracis*, содержащимися в грунте. Во-вторых, в ранний период жизни их ЖКТ адаптирован для молочной диеты. Даже телята жвачных по строению и физиологии ЖКТ схожи с моногастрическими животными. В частности, у детенышей жвачных недоразвит рубец, а в пищеварении участвует преимущественно съчуг и тонкий кишечник [40]. В отличие от взрослых с их многокамерным объемистым желудком и низкой скоростью пищеварения, у телят функционирует один желудок с более низким рН, отмечается высокая активность собственных пищеварительных ферментов и большая скорость пищеварения, которые в совокупности могут создавать неблагоприятные условия для выживания и прорастания спор *B. anthracis*, снижая вероятность развития инфекции.

Воздушно-пылевой путь распространения сибирской язвы. Как упоминалось выше, ингаляционная форма сибирской язвы – одна из наиболее тяжелых и приводит к 100 % гибели при отсутствии терапии. Для ее развития необходимо прорастание спор *B. anthracis* в альвеолярных фагоцитах и дендритных клетках [15, 16] и/или в лимфоидной ткани верхних дыхательных путей [41]. Следовательно, для начала инфекционного процесса требуется доставка спор в соответствующие отделы дыхательной системы [15, 16]. Соответственно, споры должны находиться в аэрозолированном состоянии в виде воздушной взвеси, вдыхаемой восприимчивым животным. Так как в природных экосистемах спорообразование *B. anthracis* происходит в почве, практически единственным источником таких аэрозолей может быть пыль, образующаяся из почвы на месте гибели животного, больного сибирской язвой. Под действием ветра, при перемещении стад животных или при купании животных в пыли из почвы могут образовываться пылевые облака, а если почва была контаминирована спорами *B. anthracis*, то и пылевое облако будет содержать эти споры. Такая зараженная пыль может вдыхаться, попадать на слизистую глаз, в повреждения кожи или просто налипать на шкуру и потом проглатываться при облизывании, что теоретически может привести к развитию соответ-

ствующей формы сибирской язвы. Но в то же время легочная сибирская язва не столь часто встречается в природе, как можно было бы ожидать. Главной причиной тут выступает сравнительно высокая заражающая доза. Так, лабораторные исследования показывают, что в зависимости от вида животного и методических особенностей конкретного эксперимента LD₅₀ при ингаляторном заражении сибиряккойной инфекцией составляет от 10³ до 10⁶. В среднем ее порядок – несколько сотен тысяч спор [42], и при этом она резко возрастает по мере увеличения размера аэрозольных частиц [43]. В то же время концентрация спор *B. anthracis* в местах захоронения животных, погибших от сибирской язвы, в большинстве случаев составляет 10¹–10³ КОЕ/г сухой почвы (или иного образца) [44–46]. Например, P.M. Lindeque *et al.* приводит такую статистику по содержанию спор сибиряккойного микробы в почве на месте гибели больных сибирской язвой антилоп: 25 % почвенных участков содержали 1–10 спор/г почвы, 29 % – 11–100 спор/г, 25 % – 101–1000 спор/г, 10 % – 1001–10000 спор/г, 7 % – 10001–100000 спор/г и 4 % – более 1000000 спор/г [37]. Таким образом, несложный расчет показывает, что для развития легочной инфекции необходимо разово вдохнуть не менее 1 г пыли, что представляется маловероятным. Р.С. Turnbull *et al.* в работе [47] измеряли концентрацию спор *B. anthracis* в воздухе с наветренной стороны от старых почвенных очагов сибирской язвы, содержащих от 2·10⁴ до 1,6·10⁶ КОЕ/г почвы в национальном парке Этоша (Намибия) после механического воздействия на почву, имитирующего поднятие пыли при движении животных. При этом оказалось, что содержание спор на расстоянии 6–18 м от почвенного очага составляло не более 2 КОЕ/л воздуха. Исходя из средней частоты дыхания животных и объема вдыхаемого воздуха, авторы произвели расчет, согласно которому для вдыхания одной споры *B. anthracis* мелким копытным требуется 5–7 минут, крупным – 0,3–0,7 минуты, а человеку – около 2,5 минуты. Если учесть высокие значения LD₅₀ при ингаляторном заражении сибирской язвой, становится очевидно, что подобный механизм заражения едва ли может иметь ощутимую эпидемическую значимость. Тем не менее следует отметить, что при большой численности группы риска можно оперировать не только LD₅₀, но и показателями LD₁₀ и даже LD₁. Для ингаляторной сибирской язвы эти значения для человека, по некоторым расчетам, составляют десятки спор и единичные споры, соответственно [48]. Конечно, для копытных эти значения могут быть несколько иными, но даже если они ниже на порядок, то низкий шанс развития заболевания у отдельной особи может компенсироваться высокой численностью особей в стаде. Кроме того, чем больше численность стада, тем сильнее оно поднимает пыль при движении и, соответственно, тем большее время экспозиции отдельной особи в пылевом облаке, а значит, и ее шанс заразиться.

Отдельно можно остановиться на такой поведенческой реакции многих животных, как купание в пыли, и ассоциированном с ней риске развития ингаляторной сибирской язвы. Действительно, принимая пылевую ванну, животное длительное время находится в центре поднятого им же самим пылевого облака, что значительно увеличивает потенциальный риск вдыхания содержащихся в этой пыли микроорганизмов, в том числе и спор *B. anthracis*, если купание происходит на месте гибели животного, больного сибирской язвой [49]. Но потенциальная значимость купания в пыли в распространении сибирской язвы не подтвердилась полевыми наблюдениями. Несмотря на привычку многих животных купаться в пыли, рядом с останками животных, погибших от сибирской язвы, следы пылевых ванн не обнаруживаются. Видимо, животные избегают купаться в пыли поблизости от трупов, причиной чего могут быть, например, химические изменения почвы на месте разложения трупа, делающие ее менее привлекательной для купания [49], или то, что труп погибшего животного привлекает многочисленных хищников и падальщиков, запах которых еще длительное время может отпугивать травоядных. Кроме того, оказалось, что сезонность пылевых купаний и пик смертности от сибирской язвы не совпадают по времени [49].

Подводя итоги, можно сказать, что распространение ингаляционной сибирской язвы в природе, по всей видимости, если и происходит, то имеет лишь эпизодический характер и не вносит весомого вклада в эпидемиологию этой инфекции.

Тем не менее именно ингаляционная сибирская язва привлекает внимание многих исследователей благодаря таким антропогенным аспектам ее распространения, как непреднамеренное аэрозолирование спор *B. anthracis* при промышленной обработке продукции животного происхождения, полученной из больных сибирской язвой животных [50], или целенаправленное создание споросодержащих аэрозолей в военных целях [51], которые достаточно полно описаны в литературе, а потому остались за рамками данного обзора.

Инокуляционный путь передачи сибирской язвы. Сибиряккойный микроб – это неинвазивный микроорганизм, у него отсутствуют механизмы самостоятельного внедрения в организм хозяина через его внешние покровы. Но при внешнем воздействии, нарушающем целостность покровов макроорганизма, в его внутреннюю среду могут заноситься различные микроорганизмы, в том числе споры или вегетативные клетки *B. anthracis*, вызывая сибирскую язву. В природных экосистемах такое распространение сибирской язвы может осуществляться кровососущими членистононогими. Наибольшую опасность при этом представляют кровососущие двукрылые, в первую очередь мухи, а именно представители семейств *Tabanidae* (слепни, или табаниды) и *Hippoboscidae*

(кровососки), которые, кусая больное сибирской язвой животное с бактериемией, могут сохранять жизнеспособные бактерии *B. anthracis* на ротовом аппарате более одной-двух недель в желудочно-кишечном тракте [52]. Кусая после этого здоровое животное, они могут его заразить сибирской язвой, тем самым распространяя инфекцию на десятки километров от первичного очага. Стоит заметить, что острые опыты по заражению крупных животных с помощью кровососущих мух показали, что для летальной инфекции требуется, чтобы на одном животном кормилось не менее нескольких десятков мух, до этого кормившихся на больном животном, у которого сибирская язва развилась до стадии бактериемии. Единичные укусы в большинстве случаев либо не приводят к заражению, либо же инфекция проходит в сравнительно легкой кожной форме и не приводит к смерти [53]. Тем не менее при высокой плотности популяции слепней они способны превращать единичные случаи сибирской язвы в эпизоотии среди диких и домашних копытных [30]. Интересно, что табаниды в определенной степени опосредуют влияние климатических факторов (количество и сезонность осадков, роза ветров) на эпидемиологию сибирской язвы. Так, благодаря особенностям биологии табанид, на их численность влияет количество осадков весной и ранним летом (в полосе умеренного климата Северного полушария): при засухе в этот период количество слепней уменьшается, при обилии осадков – возрастает. Это отражается на вероятности возникновения вспышек сибирской язвы в некоторых эндемичных регионах [30]. Кроме того, успешное кормление слепней на млекопитающих возможно только при скорости ветра менее 3,3 м/с. Эта особенность приводит к «мозаичности» на карте выявления случаев сибирской язвы – описаны вспышки, при которых животные, пасущиеся на вершине холмов, где постоянно дует сильный ветер, не заболевали, в то время как рядом, в защищенных от ветра низинах, отмечались множественные случаи сибирской язвы [54].

Достаточно мало известно про роль в передаче сибирской язвы других кровососущих двукрылых, например комаров. Существует ряд экспериментальных работ, в которых показано, что комары способны передавать сибирскую язву от больного животного к здоровому [55, 56]. Но подобные статьи крайне малочисленны и опубликованы достаточно давно. Нам не удалось отыскать более современных работ, в которых роль комаров или других кровососущих членистоногих (виши, блохи, клещи) была бы изучена подробно или подтверждена полевыми и клиническими наблюдениями.

Описывая роль насекомых в эпидемиологии сибирской язвы, стоит сделать небольшое отступление от темы и упомянуть возможность механического переноса *B. anthracis* некровососущими мясными и домашними мухами, которые, питаясь

на тушах погибших от сибирской язвы животных, могут распространять споры возбудителя со своими выделениями, в том числе контаминируя ими близлежащую растительность, которую могут поедать травоядные и заражаться при этом сибирской язвой [57, 58]. В природных экосистемах инокуляционное заражение сибирской язвой возможно, видимо, только при укусах кровососущих двукрылых, но для людей описана еще одна редкая форма инокуляционной передачи сибирской язвы – инъекционная. Хоть эта крайне специфическая форма сибирской язвы и не имеет прямого отношения к теме данного обзора, она позволяет в несколько новом свете взглянуть на вопрос сохранности спор сибиризированного микробы в продукции растительного происхождения при ее технологической обработке. Эта клиническая форма была выявлена среди инъекционных опиатных наркоманов, вводящих себе препараты героина, которые оказались контаминированными спорами *B. anthracis*. По клинической картине инъекционная сибирская язва может рассматриваться либо как самостоятельное заболевание, либо как тяжелая форма кожной сибирской язвы, сопровождающаяся массивными отеками и некротическими поражениями и характеризующаяся примерно 30 % летальностью [59–61]. Очевидно, что подобные случаи достаточно редки и встречаются только среди очень узкой маргинализированной прослойки населения. Тем не менее они – практически единственная возможность возникновения массовых случаев сибирской язвы у людей в развитых странах с отложенными системой ветеринарного и санитарного надзора, поэтому они достаточно подробно изучены. Но, к сожалению, изучение таких случаев ограничивается описанием клинической картины, особенностей их диагностики и терапии, а также проведением молекулярно-генетической характеристики выделенных от больных штаммов. При этом ретроспективный эпиданализ либо не был проведен, либо остался не опубликованным. И такие вопросы, как размер заражающих доз и механизмы контаминации инъекционных препаратов, остаются без ответа. А последний аспект наиболее интересен, так как именно он указывает на то, достаточно ли было выращивания исходного растительного сырья (мака) на контаминированной почве или споры *B. anthracis* попали в препарат на каких-либо этапах его изготовления, фасовки и транспортировки, и, соответственно, какие технологические этапы способны пережить без утери жизнеспособности.

Контактная передача сибирской язвы. Контактный путь предусматривает прямую передачу инфекции между больной и здоровой особями, не связанными в данный момент трофическими отношениями. Поскольку *B. anthracis* является неинвазивным микроорганизмом, для успешной передачи инфекции контактным путем среди животных требуется совпадение ряда условий: 1) наличие у больного животного бактериемии и повреждений

кожи, из которых контаминированная кровь попадает наружу; 2) наличие повреждений кожи у здорового животного; 3) непосредственный контакт повреждений кожи реципиента с контаминированной кровью донора.

Очевидно, что подобное стечание обстоятельств в природе достаточно маловероятно. Поэтому сибирская язва считается неконтагиозным заболеванием [15, 17]. Единственным важным исключением, пусть и с некоторыми оговорками, можно счесть кожную сибирскую язву человека. Эта форма инфекции характерна в первую очередь для персонала, занятого животноводством и сопутствующими технологическими процессами (забой скота, разделка туш, переработка мяса, шкур, шерсти и т.д.), при которых есть риск инфицирования через травмы кожи рук, лица и шеи. Но, несмотря на высокий удельный вес такого способа передачи сибирской язвы именно для человека (около 95 % всех случаев сибирской язвы [15]) и, соответственно, его медицинскую значимость, он является, по сути, тупиковым, так как дальнейшей передачи инфекции от заболевшего человека не происходит, и малозначимым для эпидемиологии в природных экосистемах.

Описаны лишь отдельные случаи, которые можно с натяжкой отнести к контактному пути заражения сибирской язвой в природе. Например, во время вспышки сибирской язвы у северных оленей на Ямале в 2016 г. мы наблюдали следующий случай. Один из первых заболевших оленей вовремя получил инъекцию бициллина, через несколько часов после которой он пошел на поправку, смог самостоятельно подняться и был допущен аборигенами к животным, с которыми его до болезни постоянно запрягали в одну упряжку. Этот излеченный олень и ранее здоровые олени при встрече обнюхивали друг друга и терлись мордами, после чего здоровые олени практически одновременно заболели сибирской язвой и умерли через сутки [8]. Вероятно, имело место заражение через слизистые носа и глаз. Однако это наблюдение было единичным, не подтвержденным соответствующими исследованиями, и может быть объяснено стечением обстоятельств.

Таким образом, несмотря на достаточно широкое распространение *B. anthracis* в современном мире, этот вид, по принятым на данный момент представлениям, возник сравнительно недавно, и его история насчитывает не более нескольких десятков тысячелетий [62, 63]. Таким образом, и формирование вида *B. anthracis*, и его распространение по земному шару произошло, по сути, на глазах анатомически современного человечества. Переход к производящему хозяйству и развитие животноводства создали идеальные условия для эпидемий: постоянно поддерживающиеся крупные поголовья животных, зачастую содержащиеся в скученных условиях на ограниченной территории и получающие централизованное питание из

одного источника. И все время, от формирования первых аграрных цивилизаций до нового времени, сибирская язва была спутником человечества. Она успела распространиться по всему миру, кроме Антарктиды, причем это распространение, по всей видимости, имеет именно антропогенную природу [64]. Человеческая деятельность, будь то заселение новых территорий, военные походы или торговые операции, сопровождалась перемещением домашних, выочных и верховых животных, а также товаров животного происхождения: мяса, шкур, меха, шерсти и изделий из них. Некоторые из этих животных могли болеть сибирской язвой, а часть товаров могла быть контаминирована спорами *B. anthracis*. И таким образом сибиреязвенный микроб распространялся на значительные расстояния и попадал в новые для себя экологические ниши. Но постепенное развитие системы санитарного и ветеринарного контроля, вакцинопрофилактики и терапии сибирской язвы привели к тому, что подобное перемещение штаммов *B. anthracis* стало практически невозможным, а вспышки сибирской язвы стали крайне редкими, по крайней мере, в развитых странах. И хотя подобная эффективная система противоэпидемических мероприятий позволяет свести к минимуму количество потерь среди людей и животных и минимизировать экономический ущерб от сибирской язвы, в то же время она делает невозможным наблюдение за закономерностями эпидемического процесса среди животных, такими как динамика численности заболевших, смещение эпидемических очагов в пространстве, периодичность вспышек заболевания и дифференциальная чувствительность различных групп животных к сибирской язве. Единственной возможностью изучения таких аспектов эпидемиологии сибирской язвы в современном мире являются полевые наблюдения в немногочисленных экосистемах, в которых она до сих пор продолжает свободно циркулировать: в малонаселенных boreальных и аридных регионах. Изучение эпидемиологии сибирской язвы в таких малозначимых с хозяйственной точки зрения регионах, на первый взгляд, кажется не имеющим заметного прикладного значения. Но циркулирующий в них *B. anthracis* не только продолжает влиять на численность диких животных, в том числе и охраняемых видов, но и, при неблагоприятном стечении обстоятельств, проникает из этих экосистем в более населенные регионы с развитым сельским хозяйством и вызывает экономические и людские потери. И понимание указанных выше эпидемиологических особенностей может в определенной мере помочь в прогнозировании таких нежелательных последствий и противодействии им. Кроме того, изучение эпидемиологии сибирской язвы именно в природных экосистемах дает редкую возможность проследить крайне интересный процесс адаптации эволюционно молодого патогена к давно сложившимся

экосистемам, его встраивание в кратчайшие с точки зрения эволюции сроки в сложные взаимосвязи между почвенной микрофлорой, растениями, травоядными и хищниками.

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

Список литературы / References

1. Collier R.J. Membrane translocation by anthrax toxin. *Mol. Aspects Med.* 2009; 30(6):413–22. DOI: 10.1016/j.mam.2009.06.003.
2. Swick M.C., Koehler T.M., Driks A. Surviving between hosts: sporulation and transmission. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(4):10.1128/microbiolspec.VMBF-0029-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0029-2015.
3. Park J.M., Greten F.R., Li Z.W., Karin M. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science*. 2002; 297(5589):2048–51. DOI: 10.1126/science.1073163.
4. Sharma S., Bhatnagar R., Gaur D. *Bacillus anthracis* poly-γ-D-glutamate capsule inhibits opsonic phagocytosis by impeding complement activation. *Front. Immunol.* 2020; 11:462. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00462.
5. Ehling-Schulz M., Lereclus D., Koehler T.M. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiol. Spectr.* 2019; 7(3):10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018.
6. Dragon D.C., Rennie R.P. The ecology of anthrax spores: tough but not invincible. *Can. Vet. J.* 1995; 36(5):295–301. PMID: 7773917; PMCID: PMC1686874.
7. Brawand S. G., Kittl S., Dettwiler M., Thomann A., Feyer S., Cachim J., Theubet G., Liechti N., Wittwer M., Schürch N., Oberhänsli S., Heinimann A., Jores J. An unusual case of bovine anthrax in the canton of Jura, Switzerland in 2017. *BMC Vet. Res.* 2019; 15(1):265. DOI: 10.1186/s12917-019-1996-4.
8. Timofeev V., Bahtejeva I., Mironova R., Titareva G., Lev I., Christiany D., Borzilov A., Bogun A., Vergnaud G. Insights from *Bacillus anthracis* strains isolated from permafrost in the tundra zone of Russia. *PLoS One*. 2019; 14(5):e0209140. DOI: 10.1371/journal.pone.0209140.
9. Anthrax in humans and animals. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 2008.
10. Finke E.J., Beyer W., Loderstädt U., Frickmann H. Review: The risk of contracting anthrax from spore-contaminated soil – A military medical perspective. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*. 2020; 10(2):29–63. DOI: 10.1556/1886.2020.00008.
11. Ngetich W. Review of anthrax: a disease of animals and humans. *Int. J. Agric. Environ. Bio-res.* 2019; 4(1):123–34.
12. Munyua P., Bitek A., Osoro E., Pieracci E.G., Muema J., Mwatondo A., Kungu M., Nanyangi M., Gharpure R., Njenga K., Thumbi S.M. Prioritization of zoonotic diseases in Kenya, 2015. *PLoS One*. 2016; 11(8):e0161576. DOI: 10.1371/journal.pone.0161576.
13. Carlson C.J., Kracalik I.T., Ross N., Alexander K.A., Hugh-Jones M.E., Fegan M., Elkin B.T., Epp T., Shury T.K., Zhang W., Bagirova M., Getz W.M., Blackburn J.K. The global distribution of *Bacillus anthracis* and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife. *Nat. Microbiol.* 2019; 4(8):1337–43. DOI: 10.1038/s41564-019-0435-4.
14. Webb G.F. A silent bomb: the risk of anthrax as a weapon of mass destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100(8):4355–6. DOI: 10.1073/pnas.0830963100.
15. Savransky V., Ionin B., Reece J. Current status and trends in prophylaxis and management of anthrax disease. *Pathogens*. 2020; 9(5):370. DOI: 10.3390/pathogens9050370.
16. Cieslak T.J., Eitzen E.M.Jr. Clinical and epidemiologic principles of anthrax. *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 5(4):552–5. DOI: 10.3201/eid0504.990418.
17. CDC Anthrax. [Internet]. URL: <https://www.cdc.gov/anthrax/index.html> (Accessed: October 10, 2019).
18. Zasada A.A. Injectional anthrax in human: A new face of the old disease. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2018; 27(4):553–8. DOI: 10.17219/acem/68380.
19. Carlson C.J., Getz W.M., Kausrud K.L., Cizauskas C.A., Blackburn J.K., Bustos Carrillo F.A., Colwell R., Easterday W.R., Ganz H.H., Kamath P.L., Økstad O.A., Turner W.C., Kolsto A.B., Stenseth N.C. Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (*Bacillus anthracis*). *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2018; 93(4):1813–31. DOI: 10.1111/brv.12420.
20. Turner W.C., Kausrud K.L., Krishnappa Y.S., Cromsigt J.P., Ganz H.H., Mapaure I., Cloete C.C., Havaruia Z., Küsters M., Getz W.M., Stenseth N.C. Fatal attraction: vegetation responses to nutrient inputs attract herbivores to infectious anthrax carcass sites. *Proc. Biol. Sci.* 2014; 281(1795):20141785. DOI: 10.1098/rspb.2014.1785.
21. Ganz H.H., Turner W.C., Brodie E.L., Kusters M., Shi Y., Sibanda H., Torok T., Getz W.M. Interactions between *Bacillus anthracis* and plants may promote anthrax transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(6):e2903. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002903.
22. Joly K., Gurarie E., Sorum M.S., Kaczensky P., Cameron M.D., Jakes A.F., Borg B.L., Nandintsetseg D., Hopcraft J.G.C., Buuveibaatar B., Jones P.F., Mueller T., Walzer C., Olson K.A., Payne J.C., Yadamsuren A., Hebblewhite M. Longest terrestrial migrations and movements around the world. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):15333. DOI: 10.1038/s41598-019-51884-5.
23. Cizauskas C.A., Bellan S.E., Turner W.C., Vance R.E., Getz W.M. Frequent and seasonally variable sublethal anthrax infections are accompanied by short-lived immunity in an endemic system. *J. Anim. Ecol.* 2014; 83(5):1078–90. DOI: 10.1111/1365-2656.12207.
24. Fox M.D., Boyce J.M., Kaufmann A.F., Young J.B., Whitford H.W. An epizootiologic study of anthrax in Falls County, Texas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1977; 170(3):327–33. PMID: 401803.
25. Turner W.C., Kausrud K.L., Beyer W., Easterday W.R., Barandongo Z.R., Blaschke E., Cloete C.C., Lazak J., Van Ert M.N., Ganz H.H., Turnbull P.C., Stenseth N.C., Getz W.M. Lethal exposure: An integrated approach to pathogen transmission via environmental reservoirs. *Sci. Rep.* 2016; 6:27311. DOI: 10.1038/srep27311.
26. Hanna P.C., Ireland J.A. Understanding *Bacillus anthracis* pathogenesis. *Trends Microbiol.* 1999; 7(5):180–2. DOI: 10.1016/s0966-842x(99)01507-3.
27. Frederick R.S., Ernest T.T., David R.F. Medical aspects of chemical and biological warfare. Washington: Office of the Surgeon General, Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center; 1997. P. 467–478.
28. Xie T., Sun C., Uslu K., Auth R.D., Fang H., Ouyang W., Frucht D.M. A new murine model for gastrointestinal anthrax infection. *PLoS One*. 2013; 8(6):e66943. DOI: 10.1371/journal.pone.0066943.
29. Bishop B.L., Lodelce J.P., Kolodziej L.E., Boone D.L., Tang W.J. The role of anthrolysin O in gut epithelial barrier disruption during *Bacillus anthracis* infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 394(2):254–9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.091.
30. Hugh-Jones M., Blackburn J. The ecology of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects Med.* 2009; 30(6):356–67. DOI: 10.1016/j.mam.2009.08.003.
31. Hugh-Jones M.E., de Vos V. Anthrax and wildlife. *Rev. Sci. Tech.* 2002; 21(2):359–83. DOI: 10.20506/rst.21.2.1336.
32. Hampson K., Lembo T., Bessell P., Auty H., Packer C., Halliday J., Beesley C.A., Fyumagwa R., Hoare R., Ernest E., Mentzel C., Metzger K.L., Mlengeya T., Stamey K., Roberts K., Wilkins P.P., Cleaveland S. Predictability of anthrax infection in the Serengeti, Tanzania. *J. Appl. Ecol.* 2011; 48(6):1333–44. DOI: 10.1111/j.1365-2664.2011.02030.x.
33. Appleby J.C. The isolation and classification of proteolytic bacteria from the rumen of the sheep. *J. Gen. Microbiol.* 1955; 12(3):526–33. DOI: 10.1099/00221287-12-3-526.
34. Fox M.D., Kaufmann A.F., Zendel S.A., Kolb R.C., Songy Jr. C.G., Cangelosi D.A., Fuller C.E. Anthrax in Louisiana, 1971: epizootiologic study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1973; 163(5):446–51.
35. Gates C.C., Elkin B.T., Dragon D.C. Investigation, control and epizootiology of anthrax in a geographically isolated, free-roaming bison population in northern Canada. *Can. J. Vet. Res.* 1995; 59(4):256–64.
36. Ruckstuhl K.E. Sexual segregation in vertebrates: proximate and ultimate causes. *Integr. Comp. Biol.* 2007; 47(2):245–57. DOI: 10.1093/icb/icb030.
37. Lindeque P.M., Turnbull P.C. Ecology and epidemiology of anthrax in the Etosha National Park, Namibia. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1994; 61(1):71–83.
38. Barboza P.S., Bowyer T.R. Sexual segregation in dimorphic deer: a new gastrocentric hypothesis. *J. Mammalogy.* 2000; 81(2):473–89. DOI: 10.1644/1545-1542(2000)081<0473:SSIDDA>2.0.CO;2.
39. Yang A., Proffitt K.M., Asher V., Ryan S.J., Blackburn J.K. Sex-specific elk resource selection during the anthrax risk period. *J. Wildl. Manag.* 2020; 84(7):1–11. DOI: 10.1002/jwmg.21952.
40. Diao Q., Zhang R., Fu T. Review of strategies to promote rumen development in calves. *Animals (Basel)*. 2019; 9(8):490. DOI: 10.3390/ani9080490.
41. Glomski I.J., Piris-Gimenez A., Huerre M., Mock M., Goossens P.L. Primary involvement of pharynx and peyer's patch in inhalational and intestinal anthrax. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6):e76. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030076.
42. Coleman M.E., Thrall B., Morse S.S., Hugh-Jones M., Massulik S. Inhalation anthrax: dose response and risk analysis. *Biosecur. Bioterror.* 2008; 6(2):147–60. DOI: 10.1089/bsp.2007.0066.
43. Druette H.A., Henderson D.W., Packman L., Peacock S. Studies on respiratory infection. I. The influence of particle size on respiratory infection with anthrax spores. *J. Hyg. (Lond)*. 1953; 51(3):359–71. DOI: 10.1017/s0022172400015795.
44. Schelkle B., Choi Y., Baillie L.W., Richter W., Buyuk F., Celik E., Wendling M., Sahin M., Gallagher T. *Caenorhabditis elegans* predation on *Bacillus anthracis*: Decontamination of spore contaminated soil with germinants and nematodes. *Front. Microbiol.*

- 2018; 8:2601. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02601.
45. Dragon D.C., Rennie R.P., Elkin B.T. Detection of anthrax spores in endemic regions of northern Canada. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91(3):435–41. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01389.x.
46. Curie M. Anthrax environmental decontamination network. [Internet]. URL: <https://aednetproject.wordpress.com> (Accessed: October 20, 2019).
47. Turnbull P.C., Lindeque P.M., Le Roux J., Bennett A.M., Parks S.R. Airborne movement of anthrax spores from carcass sites in the Etosha National Park, Namibia. *J. Appl. Microbiol.* 1998; 84(4):667–76. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.00394.x.
48. Peters C.J., Hartley D.M. Anthrax inhalation and lethal human infection. *Lancet.* 2002; 359(9307):710–1. DOI: 10.1016/s0140-6736(02)07792-9.
49. Barandongo Z.R., Mfune J.K.E., Turner W.C. Dust-bathing behaviors of African herbivores and the potential risk of inhalational anthrax. *J. Wildl. Dis.* 2018; 54:34–44. DOI: 10.7589/2017-04-069.
50. Brachman P.S., Kaufman A.F., Dalldorf F.G. Industrial inhalation Anthrax. *Bacteriol. Rev.* 1966; 30(3):646–59. DOI: 10.1128/br.30.3.646-659.1966.
51. D'Amelio E., Gentile B., Lista F., D'Amelio R. Historical evolution of human anthrax from occupational disease to potentially global threat as bioweapon. *Environ. Int.* 2015; 85: 133–46. DOI: 10.1016/j.envint.2015.09.009.
52. Kraneveld F.C., Mansjoer M. Anthrax bacilli in the digestive tract of *Tabanus rubidus*. *Nederlands-indische Bladen Voor Diergeneeskunde.* 1939; 51:62–75.
53. Kraneveld F.C., Djaenodin M. Test on the dissemination of anthrax by *Tabanus rubidus*, in horses and buffalo. *Nederlands-indische Bladen Voor Diergeneeskunde.* 1940; 52: 339–80.
54. Blackburn J.K. Evaluating the spatial ecology of anthrax in North America: examining epidemiological components across multiple geographic scales using a GIS-based approach: doctoral dissertation. LA: Louisiana State University; 2006. 141 p.
55. Turell M.J., Knudson G.B. Mechanical transmission of *Bacillus anthracis* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*). *Infect. Immun.* 1987; 55(8):1859–61. DOI: 10.1128/IAI.55.8.1859-1861.1987.
56. Morris H. Blood-sucking insects as transmitters of anthrax or charbon. LSU Agricultural Experiment Station Reports 1918. [Internet]. URL: <http://digitalcommons.lsu.edu/agexp/302> (Accessed: October 22, 2019).
57. Braack L.E., De Vos V. Feeding habits and flight range of blow-flies (*Chrysomyia* spp.) in relation to anthrax transmission in the Kruger National Park, South Africa. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 1990; 57(2):141–2.
58. Fasanella A., Scasciamacchia S., Garofolo G., Giangaspero A., Tarsitano E., Adone R. Evaluation of the house fly *Musca domestica* as a mechanical vector for an anthrax. *PLoS One.* 2010; 5(8):e12219. DOI: 10.1371/journal.pone.0012219.
59. Grunow R., Verbeek L., Jacob D., Holzmann T., Birkenfeld G., Wiens D., von Eichel-Streiber L., Grass G., Reischl U. Injection anthrax – a new outbreak in heroin users. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2012; 109(49):843–8. DOI: 10.3238/arztebl.2012.0843.
60. Russell L., Pedersen M., Jensen A.V., Søes L.M., Hansen A.B. Two anthrax cases with soft tissue infection, severe oedema and sepsis in Danish heroin users. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13:408. DOI: 10.1186/1471-2334-13-408.
61. Hanczaruk M., Reischl U., Holzmann T., Frangoulidis D., Wagner D.M., Keim P.S., Antwerpen M.H., Meyer H., Grass G. Injektional anthrax in heroin users, Europe, 2000–2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(2):322–3. DOI: 10.3201/eid2002.120921.
62. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M., Kachur S.M., Leadem-Dougherty R.R., Rhoton S.D., Zinsler G., Farlow J., Coker P.R., Smith K.L., Wang B., Kenefic L.J., Fraser-Liggett C.M., Wagner D.M., Keim P. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One.* 2007; 2(5):e461. DOI: 10.1371/journal.pone.0000461.
63. Kolstø A.B., Tourasse N.J., Økstad O.A. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu. Rev. Microbiol.* 2009; 63:451–76. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073255.
64. Vergnaud G. *Bacillus Anthracis* evolutionary history: taking advantage of the topology of the phylogenetic tree and of human history to propose dating points. *Erciyes. Med. J.* 2020; 42(4):362–9. DOI: 10.14744/etd.2020.64920.

Authors:

Timoфеев В.С., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Гончарова Ю.О., Дятлов И.А. State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, Russian Federation, 142279. E-mail: info@obolensk.org.

Об авторах:

Тимофеев В.С., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Гончарова Ю.О., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-33-39

УДК 616.912

Т.В. Трегубчак, Т.В. Бауэр, Р.А. Максютов, Е.В. Гаврилова**СЛУЧАИ ЗАРАЖЕНИЯ ОРТОПОКСВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ В МИРЕ
ЗА ПЕРИОД 2008–2018 гг.***ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Российская Федерация*

Ликвидация натуральной оспы, ежегодно уносившей миллионы человеческих жизней, стала одним из величайших успехов современной науки в области здравоохранения. Это беспрецедентное достижение стало возможным лишь благодаря повсеместной вакцинации населения. Так, последний случай заражения человека вирусом натуральной оспы произошел в 1977 г., а уже в 1980 г. на 33-й сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения рутинную вакцинацию против данной инфекции рекомендовано прекратить ввиду тяжелых поствакцинальных осложнений. Однако человечество остается уязвимым перед другими близкородственными к вирусу натуральной оспы ортопоксвирусными инфекциями. В последнее время участились случаи заражения людей такими вирусами, как вирус оспы обезьян, вирус оспы коров, вирус осповакцины, также зарегистрированы случаи заражения людей ранее неизвестными видами ортопоксвирусов. Циркулирующие в природе патогенные для человека зоонозные ортопоксвирусы требуют детального изучения и мониторинга ввиду возможности возникновения новых видов, появление которых на фоне прекращения плановой вакцинации населения против вируса натуральной оспы может привести к возникновению высокопатогенных для человека вариантов вируса. В данном обзоре представлена информация о случаях заражения людей ортопоксвирусными инфекциями в мире за период 2008–2018 гг., показаны эпидемиологический анамнез и связь между случаями заражения людей в разных странах, обусловленная циркуляцией вирусов на обширной территории, перемещением людей между странами, контактами людей с домашними и дикими животными. Также в статье представлена информация о заражении людей ранее неизвестными видами ортопоксвирусов.

Ключевые слова: вирус оспы обезьян, вирус оспы коров, вакциноподобное заболевание, ортопоксвирусная инфекция, вирус осповакцины.

Корреспондирующий автор: Бауэр Татьяна Валерьевна, e-mail: bauer_tv@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Трегубчак Т.В., Бауэр Т.В., Максютов Р.А., Гаврилова Е.В. Случаи заражения ортопоксвирусными инфекциями в мире за период 2008–2018 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 3:33–39. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-33-39.

Поступила 22.06.2020. Отправлена на доработку 02.10.2020. Принята к публ. 24.11.2020.

T.V. Tregubchak, T.V. Bauer, R.A. Maksyutov, E.V. Gavrilova**Cases of Orthopoxviral Infections around the World over a Period of 2008–2018***State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Russian Federation*

Abstract. The eradication of smallpox has become one of the greatest successes of modern health science. This great achievement was made possible thanks to the widespread vaccination of the population. The last case of human infection with smallpox virus occurred in 1977. In 1980, at the 33rd session of the World Health Assembly, routine vaccination against that infection was recommended to be discontinued due to severe post-vaccination complications. However, humanity remains vulnerable to other orthopoxvirus infections closely related to smallpox virus. Recently, the cases of human infection with orthopoxviruses such as monkeypox virus, cowpox virus, vaccinia virus have become more frequent. Also, cases of infection of people with previously unknown orthopoxvirus species are recorded. Zoonotic orthopoxviruses pathogenic for humans, circulating in nature, require a detailed study and monitoring of the emergence of new strains. Their occurrence against the background of the cessation of planned vaccination of the population against smallpox virus can lead to the emergence of new highly pathogenic viruses. This review contains information on cases of human infection with orthopoxviruses around the world for the period 2008–2018. It also describes epidemiological anamnesis and the relations between cases of human infection in different countries due to the spread of viruses over a wide area, the movement of people between countries, population contacts with domestic and wild animals. Also, this paper provides information on the infection of people with previously unknown strains of orthopoxviruses.

Key words: monkeypox virus, cowpox virus, vaccine-like disease, orthopoxvirus infection, vaccinia virus.

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

Corresponding author: Tatyana V. Bauer, e-mail: bauer_tv@vector.nsc.ru.

Citation: Tregubchak T.V., Bauer T.V., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Cases of Orthopoxviral Infections around the World over a Period of 2008–2018. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:33–39. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-33-39.

Received 22.06.2020. Revised 02.10.2020. Accepted 24.11.2020.

Tregubchak T.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9608-2044>

Bauer T.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4954-9905>

Maksyutov R.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1314-281X>

Gavrilova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7118-5749>

Род *Orthopoxvirus* относится к семейству *Poxvirus* и согласно последним данным Международного комитета по таксономии вирусов (2019) включает в себя 12 видов: непатогенные для человека вирусы – *Abatino macasapox virus*, *Akhmeta virus*, *Ectromelia virus* (вирус эктромелии), *Raccoonpox virus* (вирус оспы енота), *Camelpox virus* (вирус оспы верблюдов), *Taterapox virus*, *Volepox virus*, *Skunkpox virus* (вирус оспы скунса); вирусы, вызывающие зоонозные инфекции, – *Cowpox virus* (вирус оспы коров, ВОК), *Monkeypox virus* (вирус оспы обезьян, ВОО), *Vaccinia virus* (вирус осповакцины, ВОВ); вирусы, вызывающие антропонозные инфекции, – *Variola virus* (вирус натуральной оспы, ВНО) [1, 2].

Среди всех представителей рода одним из наиболее изученных остается ВНО, который является строго антропонозной инфекцией и не одно столетие вызывал опустошительные эпидемии, уносявшие жизни миллионов людей. Лишь в XX веке благодаря глобальной кампании по вакцинации населения человечеству удалось избавиться от натуральной оспы [3].

Прошло уже более 40 лет с момента последнего случая заражения ВНО, однако исследования по разработке вакцин, диагностических средств и противовирусных препаратов остаются актуальными в связи с регистрирующимися в наши дни случаями заражения людей зоонозными ортопоксвирусами. Также регистрируются случаи заражения людей ранее неизвестными видами вирусов, относящихся к роду *Orthopoxvirus* [4–7]. Кроме того, в настоящее время ВНО рассматривается как потенциальное биологическое оружие. В первую очередь вызывают опасения достижения в области генной инженерии, позволяющие «оживлять» вирусные агенты с использованием знаний лишь о последовательности вирусного генома [8]. Данный факт не исключает возможности получения высокопатогенных для человека ортопоксвирусов в лабораторных условиях. Помимо антропогенного фактора появления подобных вирусных агентов, существует угроза естественного возникновения высокопатогенных штаммов в результате естественной эволюции близкородственных ортопоксвирусов.

Исследовательские работы последних лет значительно улучшили понимание молекулярных процессов, обеспечивающих жизнедеятельность ортопоксвирусов. Полученные знания о функциях вирусных белков позволяют исследователям разрабатывать новые таргетные противовирусные препараты, а изучение свойств факторов вирулентности и факторов, ограничивающих круг хозяев, позволяет прогнозировать, насколько опасен вновь обнаруженный изолят вируса [9]. Таким образом, обезопасить человечество от вновь возникающих высокопатогенных штаммов ортопоксвирусов возможно лишь благодаря совместным усилиям вирусологических, молекулярно-биологических исследований и своевременному эпидемиологическому надзору.

В данном обзоре представлена информация об основных случаях заражения людей ортопоксвирусными инфекциями в мире за последнее десятилетие с указанием эпидемиологического анамнеза, а также дана краткая характеристика штаммов вирусов, которых были заражены люди.

Оспа обезьян. После прекращения плановой вакцинации против ВНО, ВОО стал актуальной проблемой общественного здравоохранения, поскольку сниженный уровень коллективного противоопасенного иммунного ответа привел к увеличению количества случаев заражения людей ВОО, при этом вирус способен вызывать до 10 % летальных исходов. Впервые ВОО выявлен в 1958 г. при изучении болезни у яванских макак в Копенгагене [10]. Первый документально зафиксированный случай заражения человека ВОО произошел в 1970 г. в Заире. С тех пор отмечали спорадические вспышки на эндемичной территории для данной инфекции – Африке, а наиболее часто – в бассейне реки Конго и в Западной Африке. До 2017 г. регистрировали несколько вспышек и спорадические случаи в районах Центральной и Западной Африки, включая Камерун, Центральноафриканскую Республику, Конго-Браззавиль, Кот-д'Ивуар, Демократическую Республику Конго, Габон, Либерию, Нигерию, Сьерра-Леоне и Южный Судан [11]. Увеличивающееся количество случаев заражения людей ВОО обусловлено совокупностью нескольких факторов: прекращением вакцинации против ВНО, увеличением случаев взаимодействия с дикими животными ввиду вырубки лесов, миграцией населения и увеличением его плотности, а также потреблением в пищу мяса диких животных [12].

В 2010 г. в Демократической Республике Конго (ДРК) 10 человек обратились с подозрением на заражение ВОО, и в двух случаях диагноз был подтвержден. Генетическое исследование выделенных изолятов вируса, охватывающее приблизительно 80 тыс. пар нуклеотидов (область между OPT E9L и A24R), указывает на то, что изолят, выделенный в 2010 г., имеет гомологию 99,5 % с вирусом, вызвавшим вспышку в 2003 г. Полученные данные свидетельствуют о том, что на протяжении семи лет данный штамм вируса циркулирует на территории ДРК, и вероятность сохранения вируса в природных резервуарах достаточно высока [13].

Постоянная циркуляция ВОО в природных резервуарах может приводить к крупным вспышкам данного заболевания. Так, в сентябре 2017 г. началась вспышка оспы обезьян в Нигерии. Случаи заболевания зарегистрированы в 18 штатах: Риверс, Байельса, Кросс-Ривер, Имо, Аква-Ибом, Лагос, Дельта, Баuchi, Федеральная столичная территория, Абия, Ойо, Энугу, Экити, Насарафа, Бенуз, Плато, Эдо, Анамбра. Последние опубликованные данные, датирующиеся декабрем 2019 г., сообщают, что с сентября 2017 по декабрь 2019 г. было подтверждено 178 случаев заболевания людей, из них 9 за-

кончились летальным исходом [14]. В большинстве случаев течение заболевания проявлялось в появлении везикулопустуллярной сыпи, лихорадки (88 %), головной боли (79 %), зуда (73 %), лимфаденопатии (69 %), миалгии (63 %) и боли в горле (58 %). Стоит отметить, что у 53 % людей, которые обратились в медицинские учреждения с подозрением на оспу обезьян, вирус не обнаружен, но в сыворотке крови детектировали антитела IgG, специфичные к ортопоксвирусам [11].

Инфекция из Нигерии охватила и граничащие с ней страны. Так, в период с февраля по май 2018 г. в Камеруне зарегистрировано семь случаев заболевания оспой обезьян у человека. При этом в данной стране ранее зафиксировано только два случая заражения людей ВОО: последний случай датируется 1989 г. Затем, в 2014 и 2016 гг., в заповедниках Центрального региона Камеруна возникали вспышки оспы обезьян у приматов, но они не привели к заболеванию людей [15]. В 2018 г. у четырех пациентов из семи не удалось выделить ДНК ВОО ввиду позднего сбора биоматериала для анализа, и диагноз был подтвержден серологическим методом.

Первая вспышка оспы обезьян за пределами Африканского континента произошла в США в 2003 г.: диагностировано 47 случаев заражения людей. Источником вирусной инфекции являлись грызуны, привезенные из Ганы. До 2018 г. не регистрировались подобные завозные случаи, пока осенью 2018 г. ВОО не выявлен на территории Великобритании (нигерийский офицер военно-морского флота приехал для прохождения учебных курсов) [16]. Второй случай зафиксирован через неделю после первого: житель Великобритании вернулся из отпуска в Нигерию, где имел контакт с человеком с типичными для ортопоксвирусных инфекций кожными высыпаниями. Поскольку работа с пациентами проводилась с соблюдением всех санитарных правил, других случаев заражения не зарегистрировано [17].

Также в 2018 г. отмечен случай заражения ВОО в Израиле. В отделение неотложной медицинской помощи в Иерусалиме обратился 38-летний мужчина, который возвратился из Нигерии, где он имел контакт с тушками грызунов. По возвращении он заметил два очага поражения на гениталиях, после чего последовало повышение температуры тела и начался озноб. Через несколько дней на лице пациента появилась эритематозная сыпь, а позже – на туловище и конечностях. В ходе ПЦР-диагностики и последующего секвенирования выделенной ДНК вируса выявлено, что больной заражен ВОО западноафриканской клады, который на тот момент циркулировал в Нигерии [18].

Еще один завезенный с Африканского континента случай заражения зафиксирован в Сингапуре. Заболевшим являлся 38-летний нигерийский гражданин, который прибыл в Сингапур 28 апреля 2019 г., а 8 мая у него диагностирована оспа обезьян.

В Сингапур пациент приехал из Нигерии, где праздновал свадьбу. Вероятно, там он мог заразиться, употребляя в пищу мясо диких животных, которое могло стать источником заражения. Предприняты меры по предотвращению распространения инфекции: выявлено 23 человека, с которыми заболевший вступал в тесный контакт. Этим людям предложена вакцинация, а также в течение 21 дня за ними вели наблюдение врачи. Такой уровень готовности к возникшему случаю заражения ВОО обеспечен благодаря опыту по борьбе с другими инфекционными заболеваниями (вирус Нипах, вирус Зика). Министерство здравоохранения Сингапура регулярно оценивает риск возникновения подобных инфекций и информирует медицинских работников об эпидемиологической ситуации. В 2018 г., в ответ на вспышку оспы обезьян в Нигерии, Министерство здравоохранения Сингапура информировало медицинских работников, что обеспечило своевременное реагирование на случай заражения человека [19].

Видимый рост количества случаев заболевания людей оспой обезьян на обширной географической территории представляет собой потенциальную опасность дальнейшего распространения данной вирусной инфекции. За последние десять лет ВОО у человека зарегистрирован в большем количестве стран, чем в течение предыдущих сорока лет. Многие страны, для которых оспа обезьян является эндемичным заболеванием, не имеют достаточного опыта и знаний, необходимых для диагностирования случаев заболевания, лечения больных и предотвращения дальнейшего распространения вируса. При этом существующая статистика заражения ВОО не является полной, поскольку население стран третьего мира реже обращается в медицинские учреждения, а в случае обращения не всегда получает достаточные диагностические и лечебные процедуры.

Поскольку ВОО является вирусной инфекцией, эндемичной для Африканского континента, частота возникновения случаев заболевания оспой обезьян на иных территориях невысока. При этом на таких территориях чаще встречаются другие представители ортопоксвирусов.

Оспа коров. ВОК является возбудителем инфекции, эндемичной для стран Европы, чаще всего вызывает локальные кожные гнойничковые поражения. В некоторых случаях заражение может приводить к летальному исходу у пациентов с ослабленным иммунитетом [20, 21]. Грызуны являются природным резервуаром для данного вируса [22], при этом ВОК может инфицировать широкий спектр хозяев: инфекции зарегистрированы среди кошек, обезьян, слонов, лам и других позвоночных животных [23]. Начиная с 2000-х гг. заражение оспой коров у людей часто ассоциировалось с прямым контактом между пациентами и грызунами [24]. При этом кожные поражения главным образом возникали на участке тела, контактировавшем с животным.

Так, в 2008 г. в г. Крефельд в Германии зареги-

стрировано шесть случаев заражения людей ВОК. Все пациенты имели контакт с приобретенными в зоомагазине инфицированными крысами. Хозяева животных отмечали, что у крыс наблюдались различные симптомы болезни в виде кожных поражений, малой подвижности, общего недомогания. Заболевание у людей развивалось спустя 8–12 дней после контакта с животными [25]. В 2009 г. вблизи Мюнхена, в течение четырех дней пять пациентов обратились с жалобами на возникновение сыпи: у двух пациентов (16 лет) инкубационный период составил пять дней, у трех (42, 40, 60 лет) – семь дней. У пациентов не наблюдали лимфаденопатию и лихорадку [26]. Подобные случаи произошли во Франции. В начале 2009 г. зафиксировали четыре случая заражения людей ВОК в результате контакта с недавно приобретенными крысами. Случаи заражения данным вирусом, вероятно, связаны со случаями заражения в Германии, что подтверждает филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей выделенных штаммов вирусов [27].

В августе 2009 г. также зафиксировали случай заражения ВОК в Финляндии у 31-летней женщины, которая не имела прямого контакта с животными. На придомовой территории специалисты произвели отлов мелких грызунов, часть из которых оказались серопозитивными в отношении ортопоксвирусов, но ДНК вируса не была обнаружена [28].

Увеличивающееся число случаев заражения людей ВОК от грызунов в первую очередь обусловлено повышенным интересом к содержанию грызунов в качестве домашних животных. Схожая ситуация возникла во Франции в 2011 г.: семья приобрела четырех крыс, инфицированных ВОК, в августе 2011 г., спустя месяц, два ребенка обратились в больницу с кожными поражениями. Все четыре крысы погибли: у трех крыс заболевание протекало с проявлением тяжелой дыхательной недостаточности и двигательными расстройствами, у одной – бессимптомно. Два животных были осмотрены ветеринарным врачом, который стал третьим пациентом, инфицированным ВОК. Все три человека были заражены одним штаммом вируса, который по результатам филогенетического анализа схож с изолятами ВОК, выделенными во Франции и Германии в 2008–2009 гг. Кроме того, произошел четвертый случай заражения ВОК, заболевшим оказался родственник первых двух пациентов, но при этом он отрицал тесный контакт с приобретенными крысами, и полученный от него изолят ВОК по результатам филогенетического анализа схож с изолятом, выделенным во Франции в 2001 г. Исследователи, описавшие данные случаи заражения, предположили две гипотезы по поводу заражения людей двумя штаммами ВОК: крысы были заражены двумя разными штаммами ВОК, либо четвертый пациент был инфицирован от другого животного, поскольку сообщал о тесном контакте с лошадьми и домашними кошками [29].

Заражение человека может происходить и че-

рез промежуточных хозяев, особенно домашних кошек, которые подвержены инфицированию ВОК при контакте с грызунами. В 2015 г. зафиксирован ряд случаев заражения людей ВОК от животных – промежуточных хозяев. В Германии произошли два случая: первый случай зафиксирован в августе, второй – в октябре. Первым пациентом являлась помощница ветеринара, контактировавшая с больной кошкой, вторым – фермер, контактировавший с собаками, кроликами, овцами, свиньями и погибшими после дезинфекционных мероприятий грызунами, но точно определить источник заражения не удалось [30]. В сентябре 2015 г. зафиксирован случай заражения ребенка в сельском районе Костромской области в России. Данный случай заражения человека ВОК являлся первым лабораторно подтвержденным случаем на территории страны с 1991 г. Источник заражения определить не удалось. При этом в ходе филогенетического анализа выявили, что выделенный штамм наиболее близок к двум штаммам – CPXV-GRI-90 и Finland_2000_MAN, что свидетельствует о продолжительной циркуляции вируса в природных резервуарах на одной территории [31]. В ноябре 2015 г. зарегистрирован еще один случай заражения человека ВОК. Пациентом стал 11-летний житель Польши. Предположительно источником заражения стала домашняя кошка, на голове которой обнаружено гнойное поражение [32].

Помимо прямого контакта с животными возможны иные способы заражения ортопоксвирусными инфекциями. Например, в 2010 г. в США произошел лабораторный случай заражения ВОК, который одновременно является первым случаем заражения данным вирусом на территории этой страны. Пациентом стал научный сотрудник, проводивший эксперименты с вирусом оспы позвоночных. Вирус хранили в морозильной камере рядом с ВОК. При этом около пяти лет никаких работ с использованием ВОК не проводилось. В ходе эпидемиологического расследования ДНК ВОК обнаружена в 3 из 20 смывов с различных рабочих поверхностей в лаборатории, а также выяснили, что вирус оспы позвоночных, с которым проводили исследования, контаминирован ВОК [33].

В 2016 г. во Франции произошел атипичный случай заражения человека ВОК: на строительной площадке 45-летний мужчина был травмирован острым концом металлического ограждения. Рана долгое время не заживала, а постановка диагноза из-за первоначального подозрения на бактериальные инфекции заняла продолжительный период времени. Точно определить источник заражения не удалось, вероятно, вирусные частицы попали на железное ограждение с выделениями зараженных животных. Филогенетический анализ показал, что выделенный вирус представлял собой новый штамм ВОК France Amiens 2016 [34].

Литературные данные свидетельствуют о том, что люди, вакцинированные против ВНО, переносят

ортопоксвирусные инфекции, отличные от ВНО, бессимптомно или со смягченной симптоматикой [30]. Данный факт обусловлен перекрестным иммунным ответом на близкородственные инфекции. В качестве основ вакцин, применявшихся на протяжении глобальной кампании по ликвидации ВНО, использовались различные штаммы ВОВ, так как ВОВ из числа всех представителей рода ортопоксвирусов является наиболее безопасным вирусом для человеческой популяции, за исключением групп населения с иммуносупрессивными состояниями.

Вакциноподобное заболевание. Противооспенную вакцинацию с помощью живого ВОВ применяли во всем мире. Несмотря на эффективность применения такой вакцины, зачастую наблюдались со-пряженные с вакцинацией побочные эффекты: генерализованная вакцинация (до 70 случаев на 1 млн вакцинируемых), вакцинальная экзема (до 80 на 1 млн), прогрессирующая вакцинация (1 на 1 млн), поствакцинальный энцефалит или энцефалопатия (до 1200 на 1 млн) и смертельный случай (1 на 1 млн) [35]. Кроме того, наблюдались случаи передачи ВОВ от человека к человеку, количество таких случаев резко сократилось после прекращения массовой противооспенной вакцинации. Также в настоящее время регистрируются случаи инфицирования людей и животных ВОВ после прямого контакта с инфицированным крупным рогатым скотом, а также недавно вакцинированными людьми. Сохраняется опасность возникновения вакциноподобного заболевания ввиду циркуляции вирусов среди чувствительных к ним животных, что подтверждается выделением вируса от диких грызунов [36].

Одним из районов, где наиболее часто регистрируются вакциноподобные заболевания, является Бразилия. Так, в июне 2010 г. в сельской местности штата Минас-Жерайс зарегистрирована вспышка вакциноподобного заболевания среди крупного рогатого скота и 24 случая заражения людей. Выделенный вирусный штамм DOR2010 согласно филогенетическому анализу имел идентичность 99,7 % по гену A56R и 99,8 % по гену A26L с вирусами, входящими в группу ВОВ, вирулентными в отношении мышей [37].

Индия также является районом с повышенной частотой возникновения вакциноподобных заболеваний. С 2006 по 2008 год зарегистрировано четыре вспышки оспы буйволов в сельскохозяйственных районах, сопровождающиеся зоонозной передачей вируса человеку. Официально за данный период зафиксировано 36 случаев заражения людей. В ходе биоинформационического анализа установлено, что циркулирующие в Индии изолятами вируса оспы буйволов произошли от ВОВ штамм Lister. В Индии штамм LIVP (получен на основе штамма Lister) ранее использовался для производства вакцины против оспы на буйволах. Вероятно, данный вирус в ходе длительного пассирования на буйволах стал циркулировать в природных резервуарах на данной терри-

тории [38]. Это доказывает последующая вспышка данного заболевания, длившаяся с февраля по март 2009 г. в Колхапуре. В данном случае серьезные убытки понесло сельское хозяйство: снижение производства молока и продажи животных на 40 %, а также заражено 125 человек, которые имели контакт с крупным рогатым скотом [39].

Также для ВОВ регистрировались случаи заражения в результате лабораторных аварий. В декабре 2018 г. в Калифорнии женщина проколола палец шприцем при заражении мышей ВОВ, при этом от ранее предложенной вакцинации она отказалась [40]. Еще один случай произошел в Индии в 2010 г.: 28-летний мужчина получил порез открытой ампулой, содержащей лиофилизированный вирус оспы буйволов, выделенный от буйвола в Джалаоне. Заражение произошло ввиду неоптимизированной методики подготовки ампул с лиофилизованным вирусным материалом: сублимационная сушка вирусного материала в стеклянной ампуле при -80 °C вызвала микротрещину в стекле и на следующем этапе целостность ампулы, введенной в коллектор сушки, была нарушена. Заживление кожи у пациента в районе поврежденного участка зарегистрировали на 85-е сутки после заражения. Филогенетический анализ показал сходство на 95–100 % лабораторного изолята BPXV/Human/Lab/11 с другими вирусами оспы буйволов, выделенными в Индии [41].

В марте 2017 г. в Китае пять человек заразились ВОВ при работе с кожей инфицированных кроликов. Все пациенты работали в биофармацевтической компании и осуществляли операцию по измельчению шкурок кроликов, зараженных ВОВ. Филогенетический анализ показал сходство на 100 % выделенных вирусов от пяти пациентов между собой и на 99,6 % – с изолятом VACV-MNR-76. Сравнение с вакцинным штаммом, используемым для заражения кроликов, не удалось осуществить [42].

Помимо лабораторных и связанных с сельским хозяйством случаев заражения вакциноподобным заболеванием, встречаются нетипичные пути передачи вируса. В июле 2008 г. в США штате Мэриленд зафиксирован случай заражения человека ВОВ. Мужчина был инфицирован штаммом ACAM2000, на основе которого производили вакцину второго поколения, сменившую в январе–феврале 2008 г. Dryvax. При этом пациент не был вакцинирован, исключал контакты с иностранцами, больными животными и не выезжал за пределы страны, но сообщил, что посещал зал боевых искусств, где контактировал с человеком, у которого была сыпь. У спарринг-партнера первого пациента серологически подтвердили ортопоксвирусную инфекцию. В ходе выяснения пути заражения обнаружили еще двух посетителей данного спортивного зала, серопозитивных в отношении ортопоксвирусов, но источник вируса остался неизвестным [43].

Таким образом, наблюдается постоянная циркуляция представителей рода ортопоксвирусов в при-

родных резервуарах, в результате которой не исключена вероятность рекомбинации участков геномов ортопоксвирусов различных видов и, как следствие, появление новых высокопатогенных ортопоксвирусных инфекций человека.

Случаи заражения ранее неизвестными ортопоксвирусами. В последние десять лет в научной литературе стали появляться работы, посвященные открытию и изучению свойств новых видов ортопоксвирусов. Так, в июне 2013 г. в США проведены исследования образцов, полученных от двух зараженных мужчин в Грузии. Заражение ортопоксвирусом подтвердили серологическим исследованием – в крови пациентов обнаружены антитела IgM и IgG к ортопоксвирусам, также диагноз подтвердили ПЦР-анализом в реальном времени. Позже при проведении полногеномного секвенирования и филогenetического анализа выяснили, что выделенные изолятами ранее не были известны. Амплифицированная область гена, кодирующего ДНК-зависимую РНК-полимеразу, имела идентичность 96 % с последовательностью данного гена ВОО и 98 % идентичности с ВОК. Последовательности вирусной ДНК у обоих пациентов были идентичны по девяти консервативным генам ортопоксвирусов. Инфицированию пациентов способствовали контакты с зараженными коровами в связи с профессиональной деятельностью. В дальнейшем подтвердили наличие специфических к ортопоксвирусам антител в сыворотке крови коров и мелких грызунов [4].

Подобный случай зафиксирован в 2015 г. на Аляске. Пациент исключил возможность контактирования с потенциально зараженными людьми и животными. Путь заражения не смогли идентифицировать. Филогенетический анализ показал, что изолят вируса представляет собой особую генетическую линию ортопоксвирусов. Исследователи обозначили данный изолят как AK2015_poxvirus. При построении филогенетического дерева он был сгруппирован в пределах рода *Orthopoxvirus* и относился к кладе, содержащей все ортопоксвирусы Старого Света. Генетические расстояния, оцененные между изученными изолятами известных ортопоксвирусов Старого Света, варьировались от 0,6 % (вирус *Taterapox* и вирус *Camelpox*) до 3,2 % (вирус *Ectromelia* и вирус *Variola*) [5].

Кроме того, новые виды вирусов, принадлежащие к ортопоксвирусам, выделяют не только от людей, но и от животных. В январе 2015 г. на территории заповедника в Италии в течение трех недель погибли 12 макак. В результате гистологических, серологических и молекулярно-генетических исследований установлено, что животные заражены ранее неизвестным ортопоксвирусом, получившим название штамм *Abatino*. Данный штамм вируса в результате филогенетического анализа отнесен к эктрамелия-подобной кладе. Случаев заражения людей данным штаммом вируса не зарегистрировано [6].

В 2017 г. зафиксирован случай заражения орто-

поксвирусной инфекцией домашнего кота, который не покидал придомовой территории. Изолят вируса, выделенный от животного, получил название Italy_09/17 и оказался близким к штамму *Abatino* [7].

Подобные случаи заражения людей и животных новыми ортопоксвирусами подтверждают необходимость эпидемиологического надзора, совершенствования диагностических средств и средств вакцинопрофилактики.

Несмотря на успешное искоренение натуральной оспы, близкородственные ортопоксвирусы представляют опасность как для животных, так и для человека. Циркуляция в природе и возможность рекомбинации генетического материала различных представителей ортопоксвирусов может привести к возникновению новых вариантов вируса. Все это обусловливает необходимость постоянного мониторинга новых случаев заражения животных и человека, а также требует детального изучения вновь выявленных вирусных изолятов с целью предотвращения возникновения новых эпидемий.

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

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

References / Список литературы

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) New MSL including all taxa updates since the 2018b release. Updates approved during EC 51, Berlin, Germany, 2019. (Cited 21 Dec 2020). [Internet]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/9601>.
2. Reynolds M.G., Guagliardo S.A.J., Nakazawa Y., Doty J.B., Mauldin M.R. Understanding orthopoxvirus host range and evolution: from the enigmatic to the usual suspects. *Curr. Opin. Virol.* 2018; 28:108–15. DOI: 10.1016/j.coviro.2017.11.012.
3. Théves C., Biagini P., Crubézy E. The rediscovery of smallpox. *Clin. Microbiol. Infecc.* 2014; 20(3):210–18. DOI: 10.1111/1469-0691.12536.
4. Vora N.M., Li Y., Geleishvili M., Emerson G.L., Khmaladze E., Maghlakelidze G., Navdarashvili A., Zakhashvili K., Kokhreidze M., Endeladze M., Mokverashvili G., Satheshkumar P.S., Gallardo-Romero N., Goldsmith C.S., Metcalfe M.G., Damon I., Maes E.F., Reynolds M.G., Morgan J., Carroll D.S. Human infection with a zoonotic orthopoxvirus in the country of Georgia. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372(13):1223–30. DOI: 10.1056/NEJMoa1407647.
5. Springer Y.P., Hsu C.H., Werle Z.R., Olson L.E., Cooper M.P., Castrodale L.J., Fowler N., McCollum A.M., Goldsmith C.S., Emerson G.L., Wilkins K., Doty J.B., Burgado J., Gao J.X., Patel N., Mauldin M.R., Reynolds M.G., Satheshkumar P.S., Davidson W., Li Y., McLaughlin J.B. Novel Orthopoxvirus infection in an Alaska resident. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64(12):1737–41. DOI: 10.1093/cid/cix219.
6. Gigante C.M., Gao J., Tang S., McCollum A.M., Wilkins K., Reynolds M.G., Davidson W., McLaughlin J., Olson V.A., Li Y. Genome of Alaskapox virus, a novel orthopoxvirus isolated from Alaska. *Viruses.* 2019; 11(8):708. DOI: 10.3390/v11080708.
7. Lanave G., Dowgier G., Decaro N., Albanese F., Brogi E., Parisi A., Losurdo M., Lavazza A., Martella V., Buonavoglia C., Elia G. Novel orthopoxvirus and lethal disease in cat, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(9):1665–73. DOI: 10.3201/eid2409.171283.
8. Noyce R.S., Lederman S., Evans D.H. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLoS One.* 2018; 13(1):e0188453. DOI: 10.1371/journal.pone.0188453.
9. Prichard M.N., Kern E.K. Orthopoxvirus targets for the development of new antiviral agents. *Antiviral Res.* 2012; 94(2):111–25. DOI: 10.1016/j.antiviral.2012.02.012.
10. Von Magnus P., Andersen E.K., Petersen K.B., Birch-Andersen A. A pox-like disease in cynomolgus monkeys. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1959; 46:156–76. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1959.tb00328.x.

11. Yinka-Ogunleye A., Aruna O., Dalhat M., Ogoina D., McCollum A., Disu Y., Mamadu I., Akinpelu A., Ahmad A., Burga J., Ndoreraho A., Nkunzimana E., Manneh L., Mohammed A., Adeoye O., Tom-Aba D., Silenou B., Ipadeola O., Saleh M., Adeyemo A., Nwadiutor I., Aworabhi N., Uke P., John D., Wakama P., Reynolds M., Mauldin M., Doty J., Wilkins K., Musa J., Khalakdina A., Adedeji A., Mba N., Ojo O., Krause G., Ihewaezu C., Mandra A., Davidson W., Olson V., Li Y., Radford K., Zhao H., Townsend M., Burgado J., Satheshkumar P. Outbreak of human monkeypox in Nigeria in 2017–18: a clinical and epidemiological report. *Lancet Infect. Dis.* 2019; 19(8):872–9. DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30294-4.
12. McCollum A.M., Damon I.K. Human monkeypox. *Clin. Infect. Dis.* 2014; 58(2):260–7. DOI: 10.1093/cid/cit703.
13. Reynolds M.G., Emerson G.L., Pukuta E., Karhemere S., Muyembe J.J., Bikindou A., McCollum A.M., Moses C., Wilkins K., Zhao H., Damon I.K., Karem K.L., Li Y., Carroll D.S., Mombouli J.V. Detection of human monkeypox in the Republic of the Congo following intensive community education. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013; 88(5):982–5. DOI: 10.4269/ajtmh.12-0758.
14. An Update of Monkeypox Outbreak in Nigeria. (Cited 18 Jun 2020.) [Internet]. Available from: <https://ncdc.gov.ng/themes/common/files/sitreps/94f37c2c44615b2b3a473704490bbc32.pdf>.
15. Sadeuh-Mba S.A., Yonga M.G., Els M., Batejat C., Eyangoh S., Caro V., Etoundi A., Carniel E., Njouom R. Monkeypox virus phylogenetic similarities between a human case detected in Cameroon in 2018 and the 2017–2018 outbreak in Nigeria. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 69:8–11. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.01.006.
16. Brown K., Leggat P.A. Human monkeypox: current state of knowledge and implications for the future. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2016; 1(1):8. DOI: 10.3390/tropicalmed1010008.
17. Vaughan A., Aarons E., Astbury J., Balasegaram S., Beadsworth M., Beck C.R., Chand M., O'Connor C., Dunning J., Ghebrehewet S., Harper N., Howlett-Shipley R., Ihewaezu C., Jacobs M., Kaindama L., Katwa P., Khoo S., Lamb L., Mawdsley S., Morgan D., Palmer R., Phin N., Russell K., Said B., Simpson A., Vivancos R., Wade M., Walsh A., Wilburn J. Two cases of monkeypox imported to the United Kingdom, September 2018. *Euro Surveill.* 2018; 23(38):1800509. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.38.1800509.
18. Erez N., Achdout H., Milrot E., Paran N., Schwartz Y., Wiener-Well Y., Politi B., Tamir H., Israely T., Weiss S., Beth-Din A., Shifman O., Israeli O., Yitzhaki S., Shapira S.C., Melamed S., Schwartz E. Diagnosis of imported monkeypox, Israel, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(5):980–3. DOI: 10.3201/eid2505.190076.
19. Ng O.T., Lee V., Marimuthu K., Vasoo S., Chan G., Lin R.T.P., Lee Y.S. A case of imported Monkeypox in Singapore. *Lancet Infect. Dis.* 2019; 19(11):1166. DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30537-7.
20. Eis-Hübingen A.M., Gerritzen A., Schneweis K.E., Pfeiff B., Pullmann H., Mayr A., Czerny C.P. Fatal cowpox-like virus infection transmitted by cat. *Lancet.* 1990; 336(8719):880. DOI: 10.1016/0140-6736(90)92387-w.
21. Gazzani P., Gach J.E., Colmenero I., Martin J., Morton H., Brown K., Milford D.V. Fatal disseminated cowpox virus infection in an adolescent renal transplant recipient. *Pediatr. Nephrol.* 2017; 32(3):533–6. DOI: 10.1007/s00467-016-3534-y.
22. Baxby D. Is cowpox misnamed? A review of 10 human cases. *Br. Med. J.* 1977; 1(6073):1379–81. DOI: 10.1136/bmj.1.6073.1379.
23. Baxby D., Shackleton W.B., Wheeler J., Turner A. Comparison of cowpox-like viruses isolated from European zoos. Brief report. *Arch. Virol.* 1979; 61(4):337–40. DOI: 10.1007/BF01315021.
24. Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D., Meyer H., Capek I., Zandotti C., Charrel R.N. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):781–4. DOI: 10.3201/eid1505.090235.
25. Becker C., Kurth A., Hessler F., Kramp H., Gokel M., Hoffmann R., Kuczka A., Nitsche A. Cowpox virus infection in pet rat owners: not always immediately recognized. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2009; 106(19):329–34. DOI: 10.3238/arztebl.2009.0329.
26. Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., Busch U., Sing A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):777–80. DOI: 10.3201/eid1505.090235.
27. Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D., Meyer H., Capek I., Zandotti C., Charrel R.N. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):781–4. DOI: 10.3201/eid1505.090235.
28. Kinnunen P.M., Holopainen J.M., Hemmilä H., Piiparinne H., Sironen T., Kivelä T., Virtanen J., Niemimaa J., Nikkari S., Järvinen A., Vapalahti O. Severe Ocular Cowpox in a Human, Finland. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(12):2261–3. DOI: 10.3201/eid2112.150621.
29. Ducournau C., Ferrier-Rembert A., Ferraris O., Joffre A., Favier A.L., Flusin O., Van Cauteren D., Kecir K., Auburtin B., Védy S., Bessaud M., Peyrefitte C.N. Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(12):1996–9. DOI: 10.3201/eid1912.130256.
30. Eder I., Vollmar P., Pfeffer M., Naether P., Rodloff A.C., Meyer H. Two distinct clinical courses of human cowpox, Germany, 2015. *Viruses.* 2017; 9(12):375. DOI: 10.3390/v9120375.
31. Popova A.Yu., Maksyutov R.A., Taranov O.S., Tregubchak T.V., Zaikovskaya A.V., Sergeev A.A., Vlascchenko I.V., Bodnev S.A., Ternovoi V.A., Alexandrova N.S., Tarasov A.L., Konovalova N.V., Koroleva A.A., Bulychev L.E., Pyankov O.V., Demina Y.V., Agafonov A.P., Shchelkunov S.N., Miheev V.N. Cowpox in a human, Russia, 2015. *Epidemiol. Infect.* 2017; 145(4):755–9. DOI: 10.1017/S0950268816002922.
32. Źaba R., Jałowska M., Kowalczyk M.J., Bowszczyk Dmochowska M., Adamski Z., Szkaradkiewicz A. Cowpox virus infection in a child after contact with a domestic cat: a case report. *New Microbiol.* 2017; 40(2):148–50.
33. McCollum A.M., Austin C., Nawrocki J., Howland J., Pryde J., Vaid A., Holmes D., Weil M.R., Li Y., Wilkins K., Zhao H., Smith S.K., Karem K., Reynolds M.G., Damon I.K. Investigation of the first laboratory-acquired human cowpox virus infection in the United States. *J. Infect. Dis.* 2012; 206(1):63–8. DOI: 10.1093/infdis/jis302.
34. Andreani J., Arnault J.P., Bou Khalil J.Y., Abrahão J., Tomei E., Vial E., Le Bideau M., Raoult D., La Scola B. Atypical cowpox virus infection in smallpox-vaccinated patient, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(2):212–9. DOI: 10.3201/eid2502.171433.
35. Lane J.M., Ruben F.L., Neff J.M., Millar J.D. Complications of smallpox vaccination, 1968: results of ten statewide surveys. *J. Infect. Dis.* 1970; 122(4):303–9. DOI: 10.1093/infdis/122.4.303.
36. Borisevich S.V., Marenikova S.S., Stovba L.F., Makhlař A.A., Loginova S.Ia., Terent'ev A.I., Krotkov V.T., Perekrest V.V., Krasnianski V.P. [Vaccine-like viruses: Peculiarities of circulation in the South America]. *Vopr. Virusol.* 2014; 59(2):10–4. [In Russ.]
37. Abrahão J.S., Campos R.K., Trindade G. de S., Guimarães da Fonseca F., Ferreira P.C., Kroon E.G. Outbreak of severe zoonotic vaccinia virus infection, Southeastern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(4):695–8. DOI: 10.3201/eid2104.140351.
38. Bhanuprakash V., Venkatesan G., Balamurugan V., Hosamani M., Yogisharadhy R., Gandhale P., Reddy K.V., Damle A.S., Kher H.N., Chandel B.S., Chauhan H.C., Singh R.K. Zoonotic infections of buffalopox in India. *Zoonoses Public Health.* 2010; 57(7–8):e149–55. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2009.01314.x.
39. Venkatesan G., Balamurugan V., Prabhu M., Yogisharadhy R., Bora D.P., Gandhale P.N., Sankar M.S., Kulkarni A.M., Singh R.K., Bhanuprakash V. Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: a severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Vet. Ital.* 2010; 46(4):439–48.
40. Whitehouse E.R., Rao A.K., Yu Y.C., Yu P.A., Griffin M., Gorman S., Angel K.A., McDonald E.C., Manlutac A.L., de Perio M.A., McCollum A.M., Davidson W., Wilkins K., Ortega E., Satheshkumar P.S., Townsend M.B., Isakari M., Petersen B.W. Novel treatment of a vaccinia virus infection from an occupational needlestick – San Diego, California, 2019. *Morb. Mortal. Wkly Rep. (MMWR).* 2019; 68(42):943–6. DOI: 10.15585/mmwr.mm6842a2.
41. Riyesh T., Karuppusamy S., Bera B.C., Barua S., Virmani N., Yadav S., Vaid R.K., Anand T., Bansal M., Malik P., Pahuja I., Singh R.K. Laboratory-acquired buffalopox virus infection, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(2):324–6. DOI: 10.3201/eid2002.130358.
42. Lu B., Cui L.B., Gu M.H., Shi C., Sun C.W., Zhao K.C., Bi J., Tan Z.M., Guo X.L., Huo X., Bao C.J. Outbreak of vaccinia virus infection from occupational exposure, China, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(6):1192–5. DOI: 10.3201/eid2506.171306.
43. Hughes C.M., Blythe D., Li Y., Reddy R., Jordan C., Edwards C., Adams C., Conners H., Rasa C., Wilby S., Russell J., Russo K.S., Somsel P., Wiedbrauk D.L., Dougherty C., Allen C., Frace M., Emerson G., Olson V.A., Smith S.K., Braden Z., Abel J., Davidson W., Reynolds M., Damon I.K. Vaccinia virus infections in martial arts gym, Maryland, USA, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(4):730–3. DOI: 10.3201/eid1704.101010.

Authors:

Tregubchak T.V., Bauer T.V., Makasyutov R.A., Gavrilova E.V. State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

Трегубчак Т.В., Баур Т.В., Максютов Р.А., Гаврилова Е.В. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п.п. Колыцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, И.В. Кузнецова, О.В. Бобрышева, Т.Л. Красовская, А.Н. Куличенко

ПРОГРАММНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

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

Эффективность дифференциации бактериальных патогенов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии зависит от качества проведения пробоподготовки, соблюдения параметров анализа и от используемых статистических подходов, реализованных различными современными программными средствами. В обзоре дана краткая характеристика наиболее известного программного обеспечения, используемого при обработке и биоинформационном анализе данных времяпролетной масс-спектрометрии. Представлен перечень компьютерных платформ, программ и сред как коммерческих, так и находящихся в общем доступе. Приведены результаты индикации и идентификации возбудителей особо опасных и природно-очаговых инфекций методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с помощью общедоступного программного обеспечения – язык программирования R, Mass-Up, Microbe MS, лицензированного – MatLab, ClinProTools, а также бесплатных веб-приложений, в том числе Speclust, Ribopeaks. Представлена информация об опыте использования таких известных платформ, как MALDI BioTyper, SARAMIS Vitek-MS и Andromas, для меж- и внутривидовой дифференциации штаммов близкородственных видов патогенных микроорганизмов. Приведены результаты идентификации и дифференциации микроорганизмов методом MALDI-TOF MS на основании выявления специфических белков для перекрестного сравнения – биомаркеров. Показано, что среда языка программирования R представляет собой одну из общедоступных универсальных платформ с оптимальным сочетанием алгоритмов обработки и интерпретации большого массива масс-спектрометрических данных.

Ключевые слова: MALDI-TOF MS, белковое профилирование, индикация, идентификация.

Корреспондирующий автор: Ульшина Диана Васильевна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Кузнецова И.В., Бобрышева О.В., Красовская Т.Л., Куличенко А.Н. Программные решения для индикации и идентификации патогенных микроорганизмов методом времяпролетной масс-спектрометрии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 3:40–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-40-50.

Поступила 13.10.2020. Отправлена на доработку 15.05.2021. Принята к публ. 15.06.2021.

D.V. Ul'shina, D.A. Kovalev, I.V. Kuznetsova, O.V. Bobrysheva, T.L. Krasovskaya, A.N. Kulichenko

SOFTWARE SOLUTIONS FOR INDICATION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC MICROORGANISMS USING TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. The effectiveness of differentiation of bacterial pathogens using MALDI-TOF mass spectrometry depends on the quality of sample preparation, compliance with mass spectrometric analysis parameters and statistical approaches used, implemented by various modern software tools. The review provides a brief description of the most known software used in the processing and bioinformation analysis of time-of-flight mass spectrometry data. A list of computer platforms, programs and environments, both commercial and publicly available, is presented. The results of indication and identification of pathogens of particularly dangerous and natural-focal infections by MALDI-TOF mass spectrometry using publicly available software – programming language R, Mass-Up, MicrobeMS, licensed – MatLab, ClinProTools, as well as free web applications, including, Speclust, Ribopeaks are provided. The data on usage of such well-known platforms as MALDI BioTyper, SARAMIS Vitek-MS and Andromas (Andromas SAS, France) for inter- and intra-specific differentiation of closely related species are presented. Results of identification and differentiation of microorganisms applying MALDI-TOF mass spectrometry based on detection of specific proteins for cross-comparison – biomarkers – are given. The analysis shows that the programming language R environment is one of the publicly available universal platforms with an optimal combination of algorithms for processing and interpreting of a large array of mass spectrometric data.

Key words: MALDI-TOF MS, protein profiling, indication, identification.

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

Corresponding author: Diana V. Ul'shina, e-mail: stavnipchi@mail.ru

Citation: Ul'shina D.V., Kovalev D.A., Kuznetsova I.V., Bobrysheva O.V., Krasovskaya T.L., Kulichenko A.N. Software Solutions for Indication and Identification of Pathogenic Microorganisms Using Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Проблемы Особо Опасных Инфекций* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2021; 3:40–50. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-40-50.

Received 13.10.2020. Revised 15.05.2021. Accepted 15.06.2021.

Ul'shina D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>

Kovalev D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Kuznetsova I.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9513-0761>

Bobrysheva O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6338-4476>

Kulichenko A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

В настоящее время наравне с классическими методами индикации и идентификации микроорганизмов все чаще применяются молекулярно-биологические, к которым принято относить метод исследования белковых профилей – времяпролетную масс-спектрометрию с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Ее можно рассматривать в качестве альтернативы комплексу традиционных методов идентификации микроорганизмов, в частности бактериологическому, иммунологическому, молекулярно-генетическому (метод полимеразной цепной реакции) [1]. Опубликованы результаты эффективного применения метода MALDI-TOF MS для индикации, идентификации возбудителя чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, микроорганизмов рода *Vibrio* и др. [2–4].

Детекцию патогенных микроорганизмов методом MALDI-TOF MS, как правило, осуществляют на основании выявления на масс-спектрах пиков, характерных для основных рибосомных белков в диапазоне масс от 1000 до 20000 Да [5–9], метод экстракции которых ацетонитрилом и муравьиной кислотой после предварительной обработки 70% этанолом зарекомендовал себя как эффективный способ пробоподготовки для широкого круга микроорганизмов, обеспечивая образование достаточного количества изолированных спектральных пиков при низкой интенсивности шумовых сигналов [10–13].

Рибосомные белки как объект исследования MALDI-TOF MS. Общеизвестно, что большинство отдельных сигналов на масс-спектрах соответствует рибосомным белкам (РБ), которые обладают средней гидрофобностью и кодируются более чем 50 генами, рассеянными в основном в хромосомных локусах [10]. РБ большей частью представлены наиболее распространенными цитозольными белками, количество которых в клетках микроорганизма не зависит от стадии жизнедеятельности или условий роста [14]. Диапазон масс для РБ колеблется в пределах от 4 до 30 кДа, что определяет возможность их использования в качестве надежных биомаркеров для рутинной идентификации микроорганизмов методом MALDI-TOF MS.

Метод MALDI-TOF MS позволяет осуществлять достоверную дифференциацию бактериальных патогенов на основании выявления на масс-спектрах биомаркеров посредством комплекса статистических подходов, которые реализованы различными современными программными средствами.

Цель обзора – охарактеризовать наиболее известные в настоящее время биоинформационные подходы, используемые для индикации и идентификации патогенных микроорганизмов методом MALDI-TOF MS, реализованные в различном программном обеспечении (ПО).

Для корректной интерпретации полученных данных необходимо специализированное ПО, способное устранить погрешности визуального анализа спектров. Обработка исходных данных – необходимая

процедура, позволяющая дифференцировать аналитически значимые сигналы от шума. Выполнение основных этапов данной процедуры в сочетании с алгоритмами биоинформационного анализа определяет успех при решении конкретной научной задачи.

ПО, используемое для интерпретации данных MALDI-TOF MS. Востребовано и общедоступное ПО, например, язык программирования R, Mass-Up, MicrobeMS, лицензионное (MatLab, ClinProTools), и бесплатные веб-приложения, в том числе Speclust, Ribopeaks.

ClinProTools (Bruker Daltonics, Германия) – коммерческое ПО для быстрого и точного выявления биомаркеров в многокомпонентных бактериальных смесях. ClinProTools сочетает многочисленные комбинации вариантов визуализации и функции статистического анализа, в частности метод опорных векторов (Supported Vector Machine), искусственную нейронную сеть (Supervised Neural Network), комплексное использование которых позволяет проводить классификационное или прогностическое моделирование, например, оценивать значимость белковых маркеров в качестве предикторов рецидива и тяжести заболевания. Относительно высокая стоимость ClinProTools выступает в качестве ограничивающего фактора для использования данного ПО.

S.Y. Hsieh *et al.* (2008) провели исследование по определению чувствительности метода MALDI-TOF MS для идентификации изолятов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* в пробах клинического материала с использованием ClinProTools [15]. В ходе эксперимента определено минимальное количество бактериальных клеток в пробе, необходимое для достоверной идентификации патогенов, в частности для *E. coli* оно составило $5,8 \cdot 10^3$ м.к./мл и $5,5 \cdot 10^3$ м.к./мл – для *S. aureus*. При работе с бактериальными смесями, включающими штаммы разных видов, минимальная концентрация составила $3 \cdot 10^4$ м.к./мл. При указанной концентрации достоверно выявлено присутствие белковых биомаркеров для каждого из микроорганизмов: *E. coli* (4532, 5097, 9069 Да) и *S. aureus* (3038, 5529 Да). Следует отметить, что указанные концентрации, характеризующие чувствительность метода MALDI-TOF MS, при выявлении других микроорганизмов могут не соответствовать описанным величинам. Повидимому, минимальное количество бактериальных клеток в пробе, к примеру, для внутриклеточных возбудителей, может возрасти на несколько порядков.

M.L. Faron *et al.* (2017) опубликовали результаты исследования белковых профилей экстрактов гемокультур шести видов микроорганизмов без какой-либо дополнительной экстракции с применением ClinProTools [16]. Обработку полученных спектров проводили с использованием Genetic Algorithm: классификатора (Quick Classifier), метода опорных векторов (Support Vector Machine). На основании выявления групп уникальных биомаркеров достоверно идентифицировали 57 изолятов 6 видов

бактерий (*S. aureus*, *Streptococcus* serogroup B, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serogroup B, *Pseudomonas aeruginosa*). Достоверность подтверждали методом перекрестной проверки (за критический уровень статистической значимости принимался р-критерий $\leq 0,05$). Экспериментально установили, что для достоверной идентификации каждого вида бактерий необходимо и достаточно присутствие на масс-спектрах шести биомаркеров.

Известно, что индикация и дифференциация *Bacillus anthracis* от близкородственных бацилл затруднена высокой степенью их родства. С целью улучшения качества внутривидовой дифференциации штаммов *B. anthracis* и *B. cereus* методом MALDI-TOF MS была разработана модель машинного обучения на основе алгоритма Genetic Algorithm ПО ClinProTools, что привело к значительному росту чувствительности (100 %) и специфичности (100 %) анализа. В качестве основы используемой модели выбрали десять биомаркеров, позволяющих правильно идентифицировать изоляты возбудителя сибирской язвы от остальных представителей группы *B. cereus* [17].

Показано, что проведение биоинформационного анализа масс-спектрометрических данных с помощью алгоритма Genetic Algorithm ПО ClinProTools позволяет успешно дифференцировать 12 видов *Yersinia* spp. Кроме того, разработана и успешно апробирована модель машинного обучения, позволяющая проводить дифференциацию изолятов *Yersinia pestis* в зависимости от принадлежности к биоварам *Antiqua*, *Medievalis* и *Orientalis* [18].

Идентификация патогенных штаммов *Leptospira* spp. с помощью масс-спектрометрического анализа затруднительна из-за отсутствия эталонных масс-спектров в коммерческих таксономических базах. Представленные в литературе данные свидетельствуют об эффективном использовании метода MALDI-TOF MS на основе локальных баз данных в комплексе с биоинформационными подходами [19]. По данным авторов, для установления специфичных биомаркеров, позволяющих достоверно (99,2 %) дифференцировать штаммы видов *Leptospira interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, наиболее эффективно использовать алгоритм Genetic Algorithm. Кроме того, применение этого алгоритма позволило выявить группы биомаркеров, используемые для серотипирования патогенных leptospiр с точностью 98,1 %.

Высокая прогностическая способность модели машинного обучения, основанной на алгоритме Genetic Algorithm, позволила правильно (100 %) дифференцировать штаммы *Leptospira* spp. в зависимости от принадлежности к сероварам *Sejroe*, *Ballum*, *Tarassovi*; *Copenhageni*, *Mozdoc*, *Grippotyphosa* и *Patoc* [20]. Специфичные сигналы на масс-спектрах этого возбудителя были воспроизведимо обнаружены с помощью указанного биоинформационного анализа также для сероваров *Saxkoebing*, *Pomona*, *Australis*, *Icterohaemorrhagiae* и *Grippotyphosa* [21].

Очевидно, что возможность использования совокупности биомаркеров для дифференциации разных видов бактерий делает перспективным применение этого подхода для межвидового типирования. Анализ всего белкового профиля, учитывающего присутствие всех сигналов, может способствовать установлению родства отдельных изолятов, что существенно расширяет возможности в области интерпретации данных.

Таким образом, опыт успешного использования времяпролетной масс-спектрометрии за последнее десятилетие подтверждает достоверность результатов идентификации бактерий до рода, вида и в некоторых случаях до штамма на основании выявления уникальных белков, специфичных для конкретного патогена.

FLOSS (Free/Libre and Open Source Software) – ПО, находящееся в общем доступе.

Ribopeaks – веб-ресурс для определения таксономического положения бактерий на основе сравнительного анализа результатов масс-спектрометрического исследования и репозиториев Ribopeaks Database и Genbank. Результат анализа представляет собой график, ось абсцисс которого содержит значения m/z для каждого пика, ось ординат – частоту регистрации каждого пика. Рибосомным белкам, выявленным при идентификации исследуемого микроорганизма, присваиваются аббревиатуры L и S, относящиеся к большой или малой единице рибосомы соответственно. Веб-ресурс, использующий алгоритмы машинного обучения, позволяет проводить таксономическую классификацию на уровне рода, вида и штамма микроорганизма [22].

К достоинствам веб-приложений, на примере *Speclust* (Lund University, Швеция), можно отнести удобный интерфейс, возможность загрузки неограниченного количества исходных данных, что особенно важно при наличии большого количества реплик для каждого образца. Кроме того, в арсенал приложения включена опция по выявлению гомологичных сигналов для разных спектров, учитывая ошибки по величине m/z до нескольких Да, присутствие которых на масс-спектрах может быть обусловлено влиянием аппаратного дрейфа при регистрации ионов в среде вакуума. К недостаткам можно отнести полное отсутствие для оператора возможности участвовать в выборе алгоритма, используемого для анализа данных.

Использование приложения *Speclust* в ходе сравнительного анализа белковых профилей 38 бактериальных изолятов *Streptococcus* spp. позволило провести дифференциацию видов и подвидов: *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. canis*, *S. parauberis*, *S. salivarius*, *S. equinus* и *S. galolyticus*. Кроме того, установили специфичные для представителей рода *Streptococcus* сигналы (2112, 4452 и 5955 Да) [23].

В публикации R. El-Jeni et al. (2019) описан пример эффективного применения *Speclust* для

клластерного анализа белковых профилей штаммов *Leuconostoc* spp., это позволило провести дифференциацию представителей вида *Leuconostoc pseudomesenteroides*, а также выявить положительную корреляционную связь данных с результатами, полученными с использованием метода 16S рРНК [24].

ПО *Mass-Up* (Biomedical Research Center, Испания) сочетает алгоритмы машинного обучения (Machine Learning), реализованные с помощью языка Java, и платформы с открытым исходным кодом для обработки и анализа данных MALDI-TOF MS. Данное ПО позволяет проводить предварительную обработку исходных данных посредством интегрированных функций двух пакетов языка программирования R (MALDIquant и MassSpecWavelet), выполнять различные виды анализов (например, обнаружение биомаркеров, кластеризацию, бикластеризацию и т.д.). Построение дендрограмм проводится с помощью алгоритмов агломеративной (объединительной) иерархической кластеризации, реализованных с использованием адаптированной версии JTreeView (<http://jtreeview.sourceforge.net>). Для построения 3D-визуализации на основе результата классификации данных методом главных компонентов (PCA) используется библиотека Java с открытым исходным кодом Jzy3d (<http://www.jzy3d.org/>). К достоинствам *Mass-Up* можно отнести открытый доступ, удобный пользовательский интерфейс в сочетании с арсеналом эффективных инструментов интерпретации MALDI-TOF MS данных и то, что ПО не требует от пользователя навыков программирования.

В качестве примера эффективного применения ПО *Mass-Up* можно привести опубликованные результаты исследований Y. Torres-Corral *et al.* (2019) [25]. Согласно данным для микроорганизмов рода *Streptococcus* выявлен единственный биомаркер с массой в 4451,6 Да, который соответствовал белку L-36 (большая субчастица 50S). Остальные группы биомаркеров определили как видоспецифичные и предположительно отнесли к рибосомным субъединичным белкам и гистонам. В сравнении с этим анализ в программе MALDI BioTyper (Bruker Daltonics, Германия) позволил идентифицировать на уровне вида только 40 % от общей выборки штаммов *Streptococcus parauberis* и *S. iniae*. Остальные протестированные штаммы идентифицировали только на уровне рода.

Результаты исследования патогенных микроорганизмов с использованием ПО *Mass-Up* описаны в статье S. Christoforidou *et al.* [26]. В ходе работы идентифицировали до рода и вида 75 (100 %) изолятов возбудителя бруцеллеза. Для 47 (75,81 %) из 62 штаммов *Brucella melitensis* правильно установили принадлежность к третьему биовару. Кроме того, на основании данных MALDI-TOF MS выявили биомаркеры, позволяющие дискриминировать вакциниальный штамм *B. melitensis* Rev. 1 от остальных представителей *Brucella* spp.

Характеристики биомаркеров, позволяющих

проводить определение серовара, а также обнаружение фрагментов генов островов патогенности для бактерий рода *Legionella*, с использованием платформы *Mass-Up* изложены в работе M.A. Kyritsi *et al.* [27]. Так, для 115 из 132 штаммов *Legionella pneumophila* выявили 5 биомаркеров, определяющих принадлежность к серовару с чувствительностью – 87,5 %, специфичностью – 86,7 % и точностью – 87,1 %. Установление фрагмента гена острова патогенности *rtxA L. pneumophila* проводили на основании присутствия двух биомаркеров (чувствительность – 100 %, специфичность – 76,5 % и точность – 97,4 %). Для обнаружения фрагмента гена острова патогенности *lvhL. pneumophila* использовали один биомаркер с получением следующих характеристик: чувствительность – 82,5 %, специфичность – 100 % и точность – 84,1 %.

Дифференцирующая способность метода MALDI-TOF MS при диагностике энтеровирусного менингита изучена в работе I. Torres *et al.* (2018) [28]. С помощью ПО *Mass-Up* выявили 30 биомаркеров, позволяющих правильно дифференцировать 91 % отрицательных от 90 % положительных проб спинномозговой жидкости. По мнению авторов, метод MALDI-TOF MS может быть успешно использован в качестве экспресс-метода при диагностике энтеровирусного менингита.

ПО *MicrobeMS* – программный пакет, который распространяется бесплатно, позволяет загружать данные не только в оригинальном формате, определенном Bruker Daltonics, но также включает функцию импорта, обработки и преобразования данных в формате MatLab. Доступны стандартные манипуляции по обработке данных: сглаживание, коррекция базовой линии, нормализация, обнаружение пиков и другие функции. Количество загружаемых данных при использовании ПО ограничено лишь объемом доступной памяти. Наличие закрытого исходного кода в программе не требует от пользователя навыков программирования и позволяет проводить широкий спектр преобразований данных, формировать электронные базы масс-спектров с достаточно ограниченным комплексом возможностей для графического представления полученного результата. Среди широкого перечня доступных функций статистического анализа данных следует отметить возможность скрининга биомаркеров в ансамблях масс-спектров, проявляющих определенную степень сходства. Результат выводится в формате таблицы с перечнем маркеров, каждому значению *m/z* которых соответствуют достоверно рассчитанные абсолютные и относительные значения частоты встречаемости.

ПО *MatLab* – язык программирования/интерактивная среда для вычислительных расчетов, визуализации и программирования. ПО содержит обширную библиотеку математических функций для различного рода статистических расчетов и встроенные инструменты для создания пользовательских графиков

функций. Позволяет осуществлять взаимодействие с языками программирования и библиотеками (C, C++, Java, Python и FORTRAN), анализ данных, разработку алгоритмов, создание моделей и приложений с графическими интерфейсами. ПО MatLab предназначено для решения широкого спектра научных задач любой сложности. Основным ограничением для активного использования этого коммерческого ПО является относительно высокая стоимость.

Результаты дифференциации представителей рода *Burkholderia* методом времепролетной масс-спектрометрии опубликованы P. Martina *et al.* (2018) [29]. Анализ изолятов 18 видов *Burkholderia* spp. с помощью коммерческой системы MALDI BioTyper показал высокое сходство масс-спектров белковых экстрактов для микроорганизмов этого рода (score – 2,38–2,41). Использование программного пакета MicrobeMS на основе ПО MatLab позволило дифференцировать 62 штамма 18 видов *Burkholderia* spp. на отдельные группы, в частности *Burkholderia pyrrocinia*, *B. cenocephacia*, *B. stableis*, *B. gladioli* и др.

Выявление фенотипов и маркеров антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов методом белкового профилирования – актуальное направление в области клинической микробиологии. С помощью ПО MicrobeMS, MatLab и данных библиотеки UniProtKB/Swiss-Prot C. Blumenscheit *et al.* (2020) определили детерминанты устойчивости к противомикробным препаратам и провели идентификацию 29 изолятов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter hormaechei*, *Salmonella* spp. [30]. Выявили 11 детерминант антибиотикорезистентности, представленных 13 изоморфными белками, что позволяет говорить о высокой эффективности метода: чувствительность – 96 % (по отношению к ванкомицину) и специфичность – 100 %.

Положительную корреляционную связь результатов масс-спектрометрического исследования и методов молекулярного типирования установили R. Dieckmann *et al.* (2016) при изучении *Klebsiella oxytoca* [31]. Использование для интерпретации масс-спектров ПО MALDI BioTyre подтвердило высокое сходство масс-спектров для бактерий этого вида (score – 2,2). Только результаты кластерного анализа, полученные с помощью ПО MicrobeMS, позволили выявить внутривидовое разнообразие штаммов *K. oxytoca*. Обнаруженные белки L25 и S15 с массой 10095 и 10677 Да соответственно, специфичные для исследуемой группы изолятов *K. oxytoca*, по мнению авторов, могут быть использованы как биомаркеры при сравнении с остальными представителями *Klebsiella* spp., что подтверждает высокую дифференцирующую способность метода MALDI-TOF MS.

Среда языка программирования R относится к широко используемым инструментам анализа экспериментальных данных и клинических наблюдений. Термин «среда» предназначен для того, чтобы охарактеризовать R как единую полноценную систему, которая содержит алгоритмы интерактивного анализа

данных и в которой реализованы разнообразные классические и современные статистические подходы. Некоторые из них встроены в базу и представляют собой основу среди языка программирования R, но многие представлены в виде пакетов. Существует около 25 пакетов, загружаемых при инсталляции данного ПО (так называемые стандартные и рекомендуемые), и множество дополнительных ресурсов, распространяемых через репозитории Bioconductor и другие доступные интернет-сайты семейства CRAN (<https://CRAN.R-project.org>), а также личные веб-сайты.

В открытом доступе находится более сотни пакетов с открытым исходным кодом для масс-спектрометрического анализа, в частности, пакет MALDIquant, позволяющий осуществлять полноценную обработку, количественный и качественный анализ данных. Все пакеты доступны на веб-сайтах разработчиков и по следующим ссылкам: CRAN (<http://cran.r-project.org>), Bioconductor (<http://bioconductor.org/packages/release/BiocViews.html#MassSpectrometry>).

В статье A. Daumas *et al.* (2018) приведены результаты эксперимента по выявлению маркеров *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в пробах крови здоровых и больных сепсисом людей с использованием среди языка программирования R [32]. Установлено 10 пиков, общих для всех образцов отрицательного контроля, и 18 сигналов, ассоциированных с протеканием воспалительных процессов. По мнению авторов, метод MALDI-TOF MS позволяет воспроизведимо и точно выявлять маркеры, ассоциированные с протеканием бактериальной инфекции, в пробах крови больных людей, что можно успешно использовать при лабораторной диагностике болезни.

Времяпролетная масс-спектрометрия также используется для сравнения полученных белковых профилей с базой данных референсных масс-спектров. Для этого спектры белковых экстрактов бактериальных культур в режиме онлайн сопоставляются с референсными спектрами базы данных, предоставляемой производителем, или с in-house библиотекой, созданной пользователем, что позволяет за короткое время с высокой точностью выявить и идентифицировать возбудителей многих бактериальных инфекций. В настоящее время индикация, идентификация бактерий, вирусов и грибов методом MALDI-TOF MS проводится с использованием таких известных платформ, как MALDI BioTyper (Bruker Daltonics, Германия), SARAMIS Vitek-MS (Biomerieux, Франция) и Andromas (Andromas SAS, Франция). Качество эталонных масс-спектров и гетерогенность коллекции штаммов в базе данных определяют успешность проведения идентификации близкородственных микроорганизмов, которые характеризуются высокой степенью сходства белковых профилей. Основным недостатком этого подхода является отсутствие в открытом доступе баз данных масс-спектров возбудителей I-II групп патогенности [33].

W.C. Cheng *et al.* (2015) исследовали эффективность системы MALDI BioTyper для достоверной идентификации 56 штаммов *Vibrio* spp., выделенных от пациентов с подтвержденными бактериальными инфекциями кровотока [34]. Идентичность изолятов подтверждена с помощью молекулярно-генетических методов исследования путем секвенирования участков гена *rpoB* и *16S* рРНК. На первом этапе все штаммы, не относящиеся к *Vibrio cholerae*, были правильно идентифицированы до уровня вида, за исключением представителей *V. cholerae* серогрупп O1 и O139. Обновление базы данных масс-спектрами штаммов вида *V. cholerae*, которые не включены в исходную версию используемой базы данных, позволило правильно идентифицировать все изоляты *V. cholerae*.

Параллельно J. Rychert *et al.* (2015) оценили результаты идентификации микроорганизмов *V. cholerae*, используя платформу SARAMIS Vitek-MS. Следует отметить, что все штаммы *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 были правильно идентифицированы до уровня вида; что касается остальных представителей *Vibrio* spp., корректная идентификация получена только для 78 % штаммов [35].

Оценка эффективности использования MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа для определения таксономической принадлежности культур патогенных микроорганизмов при оперативном эпидемиологическом анализе и ретроспективном исследовании коллекционных изолятов проведена С.В. Балахоновым с соавт. (2016). Экспериментально подтверждена высокая информативность видовой идентификации патогенов (104 штамма *Y. pestis*, 92 – *V. cholerae* и 97 – *Francisella tularensis*) на основании масс-спектров рибосомных белков микробной клетки с использованием расширенной базы данных MALDI BioTyper [36].

Л.В. Мироновой с соавт. (2014) проведено комплексное определение масс-спектрометрическим и бактериологическим методами таксономической принадлежности 583 морфологически сходных с холерным вибрионом колоний в пробах из объектов окружающей среды Иркутска. Для этого использовали базу данных MALDI BioTyper в комплексе с in-house библиотекой, которая включала референсные спектры штаммов *V. cholerae*. Результаты идентификации микроорганизмов рода *Vibrio* на основании анализа структуры генов *16S*rRNA и *rpoB* показали высокую диагностическую чувствительность (100 %) и специфичность (85,4 %) метода MALDI-TOF MS, что, по мнению авторов, обуславливает целесообразность включения его в схему микробиологического исследования при мониторинге вибриофлоры поверхностных водоемов [37].

Оценка возможности использования масс-спектрометрического анализа для меж- и внутривидовой дифференциации возбудителя чумы от других представителей рода *Yersinia* проведена М.В. Афанасьевым с соавт. [38]. С помощью базы

данных MALDI BioTyper дифференцировали штаммы *Y. pestis* подвида *pestis* от подвида *altaica*. Отмечена 100 % положительная корреляция результатов масс-спектрометрической идентификации и классического культурального метода. Эффективность применения MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа для меж- и внутривидовой дифференциации изолятов *Y. pestis*, по мнению авторов, обусловливает возможность рассматривать этот метод как весьма перспективный для лабораторной диагностики возбудителя чумы.

Другой группой исследователей проведена дифференциация 11 штаммов *Y. pestis* от таксономически близкородственных видов, в том числе 32 штаммов *Yersinia enterocolitica*, 18 штаммов *Y. pseudotuberculosis* с помощью ресурсов платформы SARAMIS Vitek-MS и среди языка программирования R [39]. M. Wittwer *et al.* (2011) экспериментально определили, что для правильной дифференциации изолятов *Y. pestis* от представителей *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* необходимо и достаточно присутствие на масс-спектрах исследуемых штаммов 15 биомаркеров. Эффективность разработанного протокола MS анализа возбудителя чумы подтверждена результатами корректной идентификации штаммов *Y. pestis*, выращенных в различных условиях культивирования.

Противоположные результаты анализа штаммов *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* с использованием системы MALDI BioTyper описаны в работе L.O. Rouffaer *et al.* (2017). Поиск биомаркеров, позволяющих дифференцировать штаммы чумы, относящиеся к разным биотипам, проводили в среде языка программирования R. В ходе работы авторы выявили следующие трудности. Во-первых, корректные результаты идентификации и дифференциации получены только для штаммов *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, для остальных представителей рода *Yersinia* было определено низкое сходство белковых профилей (score – до 1,7). Во-вторых, биомаркеров, позволяющих проводить дифференциацию штаммов чумы относительно принадлежности к разным биотипам, на полученных масс-спектрах не выявлено. Низкие значения score, по мнению авторов, связаны с отсутствием масс-спектров этих видов в базе данных MALDI BioTyper [40].

Описаны результаты идентификации филогенетически наиболее близких друг другу (близкородственных) видов микроорганизмов методом MALDI-TOF MS с помощью модели машинного обучения и среди языка программирования R [41]. Способность модели машинного обучения правильно идентифицировать штаммы видов *Staphylococcus capitis*, *S. epidermidis*, *S. hemolyticus*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. warneri* вне зависимости от питательной среды и фазы роста исследуемой культуры подтверждали следующими характеристиками: чувствительность – 100 %, специфичность – 97,8 %, точность – 98,5 %

Проведен сравнительный анализ результатов идентификации изолятов *Klebsiella* spp., *Enterobacter cloacae*, *Listeria* spp., *Burkholderia cepacia*, *Bordetella* spp., *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus viridans* с использованием платформ MALDI BioTyper, SARAMIS Vitek-MS и базы данных PAPMID (Mabritec AG, Швейцария), представляющей собой библиотеку молекулярных масс рибосомных белков, рассчитанных на основе частичных или полных последовательностей бактериальных геномов [42]. Поиск биомаркеров, позволяющих проводить меж- и внутривидовую дифференциацию штаммов, осуществляли в среде языка программирования R с использованием пакета ggpubr. Высокой воспроизводимостью (100 %) обладали биомаркеры, специфичные для штаммов видов *Enterobacter cloacae*, *Burkholderia cepacia* и *Streptococcus viridans*. При идентификации штаммов *Staphylococcus aureus*, *S. argenteus* и *S. schweitzeri* с помощью MALDI BioTyper правильно идентифицировано 94,4 % штаммов, тогда как при использовании системы SARAMIS Vitek-MS – только 30,6 %. Полученные результаты авторы объяснили тем, что в базе данных MALDI BioTyper содержались масс-спектры только трех видов (*S. aureus*, *S. argenteus* и *S. schweitzeri*), тогда как в базе данных SARAMIS Vitek-MS были представлены белковые профили только для *S. aureus*. К тому же получение score >2 сразу для нескольких штаммов близкородственных видов микроорганизмов, по мнению авторов, значительно затрудняет интерпретацию результатов идентификации с помощью платформы MALDI BioTyper.

Подтверждение эффективности систем MALDI BioTyper и Andromas представлено в ходе масс-спектрометрического анализа 88 и 29 изолятов *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* [43]. При использовании MALDI BioTyper правильно идентифицировали 24- и 48-часовые культуры *N. meningitidis* с точностью 94,4 и 100 % соответственно. Для Andromas точность идентификации была ниже и составляла 88,9 и 94,4 % для 24- и 48-часовых культур *N. meningitidis* соответственно. Изоляты *N. gonorrhoeae* идентифицировали со 100 % вероятностью обеими системами. Установили, что точность идентификации культур *N. gonorrhoeae* с помощью Andromas снижается с увеличением времени инкубации. Аналогичный эффект для культур *N. meningitidis* получен в системе MALDI BioTyper. Вероятно, это может быть вызвано различиями в конструкции обеих систем, например, использовании разных математических алгоритмов для анализа данных.

Важно отметить положительный опыт MS идентификации микроорганизмов I-II групп патогенности на основе in-house библиотек. Регулярное обновление локальных баз данных в сравнении с коммерческими базами масс-спектров позволяет повысить точность идентификации методом времязаделной масс-спектрометрии возбудителей таких осо-

бо опасных инфекций, как чума [18, 44, 45], холера [46–47], туляремия [48–51].

Эффективность использования среди языка программирования R и Mass-Up оценена нами в ходе собственных исследований для биоинформационной обработки данных MALDI-TOF MS в целях идентификации и идентификации *B. anthracis*, *Brucella* spp. Используемый подход обеспечил достаточную внутривидовую дискриминирующую способность, подтверждаемую кластеризацией штаммов возбудителя сибирской язвы, соответствующей достигаемой при филогенетической оценке родства на основе генетического типирования [52]. Кроме того, указанное ПО успешно использовали при исследовании проб крови больных бруцеллезом людей [53].

Очевидно, что для повышения точности идентификации и идентификации патогенных микроорганизмов методом MALDI-TOF MS, помимо коммерческого ПО, для проведения биоинформационной обработки полученных данных необходимо дополнительное ПО. Опыт использования MALDI BioTyper, SARAMIS Vitek-MS и Andromas для идентификации патогенных микроорганизмов, во-первых, определил необходимость создания in-house библиотек масс-спектров возбудителей I-II групп патогенности. Во-вторых, при использовании указанных платформ актуальна проблема получения корректных результатов меж- и внутривидовой дифференциации штаммов близкородственных видов. В-третьих, существующие различия конструкций этих систем обусловливают невозможность обмена данными между ними.

Учитывая ошибочные результаты идентификации видов и биоваров микроорганизмов с помощью платформ MALDI BioTyper, SARAMIS Vitek-MS и Andromas, ряд исследователей предложили статистическое моделирование на основе коммерческого ПО ClinProTools. Возможность построения классификационных моделей, способных дифференцировать штаммы по рассматриваемым признакам, определила востребованность этого ПО для MS анализа возбудителей особо опасных и природно-очаговых инфекций. Основными ограничениями для эксплуатации ПО ClinProTools выступают относительно высокая стоимость лицензии и расходных материалов, необходимость стандартизации условий культивирования штаммов микроорганизмов и протоколов пробоподготовки.

При определении таксономического положения бактерий на основе сравнительного анализа результатов масс-спектрометрического исследования с помощью общедоступных веб-приложений необходимо учитывать полное отсутствие возможности для оператора участвовать в выборе алгоритма, используемого для анализа данных. Вероятно, этим обусловлено малое количество публикаций об использовании этих ресурсов. Сочетание алгоритмов машинного обучения, открытого исходного кода в совокупности с удобным пользо-

вательским интерфейсом обеспечили эффективность ПО Mass-Up при идентификации и дифференциации микроорганизмов I–IV групп патогенности. Биоинформационная обработка данных белкового профилирования с помощью программного пакета MicrobeMS на основе коммерческого ПО MatLab позволяет повысить точность идентификации микроорганизмов, выявить особенности внутривидовых таксономических единиц. Интересно, что число публикаций зарубежных исследователей, активно использующих ПО Mass-Up, MicrobeMS, превышает количество российских публикаций, что позволяет говорить о высокой востребованности данных программных продуктов за рубежом.

Многообразие современных биоинформационных программных продуктов обуславливает реализацию широкого круга задач по обработке и интерпретации MALDI-TOF MS данных. Очевидно, что наибольшей востребованностью обладает ПО, сочетающее в себе экономическую доступность с комплексом функциональных возможностей для анализа информации. На наш взгляд, среда языка программирования R – общедоступная универсальная платформа, в которой успешно совмещены алгоритмы поиска и выявления аналитически значимых сигналов (биомаркеров) с возможностью проведения различных видов статистического анализа большого массива данных с последующей визуализацией результата, представляет собой эффективное для биоинформационного анализа данных времяпролетной масс-спектрометрии программное обеспечение.

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

Список литературы

- Спицын А.Н., Уткин Д.В., Куклев В.Е., Портенко С.А., Германчук В.Г., Осина Н.А. Применение MALDI масс-спектрометрии в диагностике особо опасных инфекционных болезней: современное состояние и перспективы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; 3:77–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-3-77-82.
- Lasch P., Grunow R., Antonation K., Weller S.A., Jacob D. Inactivation techniques for MALDI-TOF MS analysis of highly pathogenic bacteria – A critical review. *TrAC – Trend. Anal. Chem.* 2016; 85:112–119. DOI: 10.1016/j.trac.2016.04.012.
- Lasch P., Jacob D., Grunow R., Schwecke T., Doellinger J. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for the identification of highly pathogenic bacteria. *TrAC – Trend. Anal. Chem.* 2016; 85:103–111. DOI: 10.1016/j.trac.2016.04.013.
- Wigmann E.F., Behr J., Vogel R.F., Niessen L. MALDI-TOF MS fingerprinting for identification and differentiation of species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019; 103(13):5323–5337. DOI: 10.1007/s00253-019-09794-z.
- Остапкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.В., Вапшукова М.А., Тотолян А.А. Идентификация *Stenotrophomonas maltophilia* с использованием методов прямого секвенирования 16S рРНКи MALDI-TOF масс-спектрометрии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(3):165–170. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-3-165-170.
- Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Чайка И.А., Гончаренко Е.В., Ломов Ю.М. Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF в идентификации и типировании штаммов холерных вибрионов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(6):375–379. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-6-375-379.
- Шаров Т.Н., Червакова М.П., Баркова И.А., Барков А.М., Викторов Д.В., Топорков А.В. Проблемы идентификации различных штаммов вегетативной формы *Bacillus anthracis* методом MALDI-TOF MS. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(5):316–318. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-3-316-318.
- Sun L., Teramoto K., Sato H., Torimura M., Tao H., Shintani T. Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of *Lactobacillus plantarum*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006; 20(24):3789–3798. DOI: 10.1002/rcm.2801.
- Suarez S., Ferroni A., Lotz A., Jolley K.A., Guérin P., Leto J., Dauphin B., Jamet A., Maiden M.C., Nassif X., Armengaud J. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J. Microbiol. Methods*. 2013; 94(3):390–396. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.07.021.
- Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012; 36(2):380–407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
- Grunow R., Jacob D., Klee S., Schlembach D., Jackowski-Dohrmann S., Loenning-Baucke V., Eberspächer B., Swidsinski S. Brucellosis in a refugee who migrated from Syria to Germany and lessons learnt. *Euro Surveill.* 2016; 21(31):30311. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.31.30311.
- Mesureur J., Arend S., Cellière B., Courault P., Cotte-Pattat P.J., Totty H., Deol P., Mick V., Girard V., Touchberry J., Burrowes V., Lavigne J.P., O'Callaghan D., Monnin V., Keriel A. A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(10):e0006874. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006874.
- Sali M., De Maio F., Tarantino M., Garofolo G., Tittarelli M., Sacchini L., Zilli K., Pasquali P., Petrucci P., Marianelli C., Francia M., Sanguineti M., Adone R. Rapid and safe one-step extraction method for the identification of *Brucella* strains at genus and species level by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One*. 2018; 13(6):e0197864. DOI: 10.1371/journal.pone.0197864.
- Ishihama Y., Schmidt T., Rappaporter J., Mann M., Hartl F.U., Kerner M.J., Frishman D. Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* cytosol. *BMC Genomics*. 2008; 9:102. DOI: 10.1186/1471-2161-9-102.
- Hsieh S.Y., Tseng C.L., Lee Y.S., Kuo A.J., Sun C.F., Lin Y.H., Chen J.K. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol. Cell. Proteomics*. 2008; 7(2):448–456. DOI: 10.1074/mcp.M700339-MCP200.
- Faron M.L., Buchan B.W., Leedeboer N.A. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures: methodology, performance, and optimization. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55(12):3328–3338. DOI: 10.1128/JCM.00868-17.
- Wei J., Zhang H., Zhang H., Zhang E., Zhang B., Zhao F., Xiao D. Novel strategy for rapidly and safely distinguishing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* by use of peptide mass fingerprints based on matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 59(1):02358-20. DOI: 10.1128/JCM.02358-20.
- Ayyadurai S., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol.* 2010; 10:285. DOI: 10.1186/1471-2180-10-285.
- Sonthayanon P., Jaresithikunchai J., Mangmee S., Thiangrongjit T., Wuthiekanun V., Amornchai P., Newton P., Phetsouvanh R., Day N.P., Roytrakul S. Whole cell matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification of *Leptospira* spp. in Thailand and Lao PDR. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019; 13(4):e0007232. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007232.
- Зуева Е.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Тотолян А.А. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ штаммов *Leptospira* spp., используемых в серодиагностике лептоспироза. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; 6:28–36.
- Rettinger A., Krupka I., Grünwald K., Dyachenko V., Fingerle V., Konrad R., Raschel H., Busch U., Sing A., Straubinger R.K., Huber I. *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiol.* 2012; 12:185. DOI: 10.1186/1471-2180-12-185.
- Tomachewski D., Galvão C.W., de Campos Júnior A., Guimaraes A.M., Ferreira da Rocha J.C., Etto R.M. Ribopeaks: a web tool for bacterial classification through m/z data from ribosomal proteins. *Bioinformatics*. 2018; 34(17):3058–3060. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty215.
- Alnakiip M.E., Rhouma N.R., Abd-Elfatah E.N., Quintela-Baluja M., Böhme K., Fernández-No I., Barros-Velázquez J. Discrimination of major and minor streptococci incriminated in bovine mastitis by MALDI-TOF MS fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing. *Res. Vet. Sci.* 2020; 132:426–438. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.07.027.
- El-Jeni R., Böhme K., El Bour M., Calo-Mata P., Kefi R.,

- Barros-Velázquez J., Bouhaouala-Zahar B. Rapid genus identification of selected lactic acid bacteria isolated from *Mugil cephalus* and *Oreochromis niloticus* organs using MALDI-TOF. *Ann. Microbiol.* 2019; 69(1):1–15. DOI: 10.1007/s13213-018-1357-8.
25. Torres-Corral Y., Fernández-Alvarez C., Santos Y. Proteomic and molecular fingerprinting for identification and tracking of fish pathogenic *Streptococcus*. *Aquaculture*. 2019; 498:322–334. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.041.
26. Christoforidou S., Kyritsi M., Boukouvala E., Ekateriniadou L., Zdragias A., Samouris G., Hadjichristodoulou C. Identification of *Brucella* spp. isolates and discrimination from the vaccine strain Rev. 1 by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mol. Cell. Prob.* 2020; 51:101533. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101533.
27. Kyritsi M.A., Kristo I., Hadjichristodoulou C. Serotyping and detection of pathogenicity loci of environmental isolates of *Legionella pneumophila* using MALDI-TOF MS. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2020; 224:113441. DOI: 10.1016/j.ijheh.2019.113441.
28. Torres I., Giménez E., Vinuesa V., Pascual T., Moya J.M., Alberola J., Martínez-Sapiña A., Navarro D. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) proteomic profiling of cerebrospinal fluid in the diagnosis of enteroviral meningitis: a proof-of-principle study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 37(12):2331–39. DOI: 10.1007/s10096-018-3380-x.
29. Martina P., Leguizamon M., Prieto C.I., Sousa S.A., Montanaro P., Draghi W.O., Stämmle M., Bettiol M., de Carvalho C.C.C.R., Palau J., Figoli C., Alvarez F., Benetti S., Lejona S., Vescina C., Ferreras J., Lasch P., Lagares A., Zorreguieta A., Leitão J.H., Yantorno O.M., Bosch A. *Burkholderia puraque* sp. nov., a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018; 68(1):14–20. DOI: 10.1099/ijsm.0.002293.
30. Blumenschein C., Pfeifer Y., Werner G., John C., Schneider A., Lasch P., Doellinger J. Unbiased antimicrobial resistance detection from clinical bacterial isolates using proteomics. *bioRxiv*. 2020. DOI: 10.1101/2020.11.17.386540.
31. Dieckmann R., Hammer J.A., Hahmann H., Wicke A., Kleta S., Dabrowski P.W., Nitsche A., Stämmle M., Al Dahouk S., Lasch P. Rapid characterisation of *Klebsiella oxytoca* isolates from contaminated liquid hand soap using mass spectrometry, FTIR and Raman spectroscopy. *Faraday Discuss.* 2016; 187:353–75. DOI: 10.1039/c5fd00165j.
32. Daumas A., Alingrin J., Ouedraogo R., Villani P., Leone M., Mege J.-L. MALDI-TOF MS monitoring of PBMC activation status in sepsis. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1):355. DOI: 10.1186/s12879-018-3266-7.
33. Lasch P., Wahab T., Weil S., Pályi B., Tomaso H., Zange S., Kiland Grannerud B., Drevinek M., Kokotovic B., Wittwer M., Pflüger V., Di Caro A., Stämmle M., Grunow R., Jacob D. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: results of an interlaboratory ring trial. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(8):2632–2640. DOI: 10.1128/JCM.00813-15.
34. Cheng W.C., Jan I.S., Chen J.M., Teng S.H., Teng L.J., Sheng W.H., Hsueh P.R. Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Vibrio* species. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(5):1741–1744. DOI: 10.1128/JCM.00105-15.
35. Rychert J., Creely D., Mayo-Smith L.M., Calderwood S.B., Ivers L.C., Ryan E.T., Boncy J., Qadri F., Ahmed D., Ferraro M.J., Harris J.B. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(1):329–331. DOI: 10.1128/JCM.02666-14.
36. Балахонов С.В., Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Куликарова Е.С., Остяк А.С. MALDI-TOF масс-спектрометрическое определение видовой принадлежности патогенов в совершенствовании эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями. *Бактериология*. 2016; 1(1):88–94. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-88-94.
37. Миронова Л.В., Басов Е.А., Афанасьев М.В., Хунхеева Ж.Ю., Миткеева С.К., Ганин В.С., Урбанович Л.Я., Куликарова Е.С., Гольдапель Э.Г., Балахонов С.В. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ с молекулярно-генетической идентификацией *Vibrio* spp. в системе мониторинга вибробиофлоры поверхностных водоемов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 19(6):27–36.
38. Афанасьев М.В., Остяк А.С., Балахонов С.В. Апробация метода масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для идентификации возбудителя чумы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 8:39–43.
39. Wittwer M., Heim J., Schär M., Dewarrat G., Schürch N. Tapping the potential of intact cell mass spectrometry with a combined data analytical approach applied to *Yersinia* spp.: detection, differentiation and identification of *Y. pestis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 2011; 34(1):12–19. DOI: 10.1016/j.syapm.2010.11.006.
40. Rouffaer L.O., Baert K., Van den Abeele A.M., Cox I., Vanantwerpen G., De Zutter L., Strubbe D., Vranckx K., Lens L., Haesbrouck F., Delmée M., Pasman F., Martel A. Low prevalence of human enteropathogenic *Yersinia* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in Flanders. *PLoS One*. 2017; 12(4):e0175648. DOI: 10.1371/journal.pone.0175648.
41. Guliev R.R., Suntsova A.Y., Vostrikova T.Y., Shchegolikhin A.N., Popov D.A., Guseva M.A., Shevelev A.B., Kurochkin I.N. Discrimination of *Staphylococcus aureus* strains from coagulase-negative staphylococci and other pathogens by Fourier transform infrared spectroscopy. *Anal. Chem.* 2020; 92(7):4943–4948. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05050.
42. Cuénod A., Foucault F., Pflüger V., Egli A. Factors associated with MALDI-TOF mass spectral quality of species identification in clinical routine diagnostics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11:646648. DOI: 10.3389/fcimb.2021.646648.
43. Morel F., Jacquier H., Desroches M., Fihman V., Kumanski S., Cambau E., Decousser J.W., Berço B. Use of Andromas and Bruker MALDI-TOF MS in the identification of *Neisseria*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 37(12):2273–2277. DOI: 10.1007/s10096-018-3368-6.
44. Lasch P., Drevinek M., Nattermann H., Grunow R., Stämmle M., Dieckmann R., Schwecke T., Naumann D. Characterization of *Yersinia* using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. *Anal. Chem.* 2010; 82(20):8464–8475. DOI: 10.1021/ac101036s.
45. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестopalов М.Ю., Остяк А.С., Витязева С.А., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Ивженко Н.И., Рождественский Е.Н., Висков Е.Н., Фомина Л.А. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *Pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 1. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013;1:60–65. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-60-65.
46. Eddabra R., Prévost G., Scheftel J.M. Rapid discrimination of environmental *Vibrio* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol. Res.* 2012; 167(4):226–230. DOI: 10.1016/j.mires.2011.09.002.
47. Emami K., Askari V., Ullrich M., Mohinudeen K., Anil A.C., Khandeparker L., Burgess J.G., Mesbah E. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One*. 2012; 7(6):e38515. DOI: 10.1371/journal.pone.0038515.
48. López-Ramos I., Hernández M., Rodríguez-Lázaro D., Gutiérrez M.P., Zarzosa P., Orduña A., March G.A. Quick identification and epidemiological characterization of *Francisella tularensis* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*. 2020; 177:106055.
49. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Splettstoesser W.D. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1061–9. DOI: 10.1128/JCM.01953-09.
50. Müller W., Hotzel H., Otto P., Karger A., Bettin B., Bockisch H., Braune S., Eskens U., Hörmansdorfer S., Konrad R., Nesselner A., Peters M., Runge M., Schmoock G., Schwarz B.A., Sting R., Myrtentäss K., Karlsson E., Forsman M., Tomaso H. German *Francisella tularensis* isolates from European brown hares (*Lepus europaeus*) reveal genetic and phenotypic diversity. *BMC Microbiol.* 2013; 13:61. DOI: 10.1186/1471-2180-13-61.
51. Ульшина Д.В., Еременко Е.И., Ковалев Д.А., Рязанова А.Г., Кузнечова И.В., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Бобрышева О.В., Сирица Ю.В., Куличенко А.Н. Выявление особенностей масс-спектров белковых экстрактов споровой и вегетативной форм возбудителя сибирской язвы методом времяпролетной масс-спектрометрии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 6:66–72. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-6-66-72.
52. Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Бобрышева О.В., Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Ковалева Н.И., Куличенко А.Н. Применение времяпролетной масс-спектрометрии для диагностики бруцеллеза и межвидовой дифференциации штаммов *Brucella* spp. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018; 7(4):15–24. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-14002.

References

- Spitsyn A.N., Utkin D.V., Kuklev V.E., Portenko S.A., Germanchuk V.G., Osina N.A. Application of MALDI mass-spectrometry for diagnostics of particularly dangerous infectious diseases: current state of affairs and prospects. *Problemy Osoboi Opasnosti Infektsii. [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2014; (3):77–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-3-77-82.
- Lasch P., Grunow R., Antoniou K., Weller S.A., Jacob D. Inactivation techniques for MALDI-TOF MS analysis of highly pathogenic bacteria – A critical review. *TrAC – Trend. Anal. Chem.* 2016; 85:112–119. DOI: 10.1016/j.trac.2016.04.012.
- Lasch P., Jacob D., Grunow R., Schwecke T., Doellinger J. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for the identification of highly pathogenic bacteria. *TrAC – Trend. Anal. Chem.* 2016; 85:103–111. DOI: 10.1016/j.trac.2016.04.013.

4. Wigmann E.F., Behr J., Vogel R.F., Niessen L. MALDI-TOF MS fingerprinting for identification and differentiation of species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019; 103(13):5323–5337. DOI: 10.1007/s00253-019-09794-z.
5. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.V., Vashukova M.A., Totolian A.A. The identification of *Stenophomonas malophilica* using the techniques of direct sequencing 16S rRNA and MALDI-TOF mass-spectrometry. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2017; 62(3):165–170. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-3-165-170.
6. Teleshmanich N.R., Chaika S.O., Chaika I.A., Goncharenko E.V., Lomov Yu.M. The mass-spectrometric analysis of MALDI-TOF in identification and typing of cholera vibrio strains/ *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2016; 61(6):375–379. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-6-375-379.
7. Sharov T.N., Chervakova M.P., Barkova I.A., Barkov A.M., Viktorov D.V., Toporkov A.V. The problems of identification of various strains of vegetative form of *Bacillus anthracis* using MALDI-TOF MS technique. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2017; 62(5):316–318. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-3-316-318.
8. Sun L., Teramoto K., Sato H., Torimura M., Tao H., Shintani T. Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of *Lactobacillus plantarum*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006; 20(24):3789–3798. DOI: 10.1002/rcm.2801.
9. Suarez S., Ferroni A., Lotz A., Jolley K.A., Guérin P., Leto J., Dauphin B., Jamet A., Maiden M.C., Nassif X., Armengaud J. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J. Microbiol. Methods.* 2013; 94(3):390–396. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.07.021.
10. Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012; 36(2):380–407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
11. Grunow R., Jacob D., Klee S., Schlembach D., Jackowski-Dohrmann S., Loening-Baucke V., Eberspächer B., Swidsinski S. Brucellosis in a refugee who migrated from Syria to Germany and lessons learnt. 2016. *Euro Surveill.* 2016; 21(31):30311. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.31.30311.
12. Mesureur J., Arend S., Cellière B., Courault P., Cotte-Pattat P.J., Totty H., Deol P., Mick V., Girard V., Touchberry J., Burrowes V., Lavigne J.P., O'Callaghan D., Monnin V., Keriel A. A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(10):e0006874. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006874.
13. Sali M., De Maio F., Tarantino M., Garofolo G., Tittarelli M., Sacchini L., Zilli K., Pasquali P., Petrucci P., Marianelli C., Francia M., Sanguineti M., Adone R. Rapid and safe one-step extraction method for the identification of *Brucella* strains at genus and species level by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One.* 2018; 13(6):e0197864. DOI: 10.1371/journal.pone.0197864.
14. Ishihama Y., Schmidt T., Rappaport J., Mann M., Hartl F.U., Kerner M.J., Frishman D. Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* cytosol. *BMC Genomics.* 2008; 9:102. DOI: 10.1186/1471-2164-9-102.
15. Hsieh S.Y., Tseng C.L., Lee Y.S., Kuo A.J., Sun C.F., Lin Y.H., Chen J.K. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol. Cell. Proteomics.* 2008; 7(2):448–456. DOI: 10.1074/mcp.M700339-MCP200.
16. Faron M.L., Buchan B.W., Ledebroer N.A. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures: methodology, performance, and optimization. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55(12):3328–3338. DOI: 10.1128/JCM.00868-17.
17. Wei J., Zhang H., Zhang H., Zhang E., Zhang B., Zhao F., Xiao D. Novel strategy for rapidly and safely distinguishing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* by use of peptide mass fingerprints based on matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 59(1):02358-20. DOI: 10.1128/JCM.02358-20.
18. Ayyadurai S., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol.* 2010; 10:285. DOI: 10.1186/1471-2180-10-285.
19. Sonthyanon P., Jaresithikunchai J., Mangmee S., Thiangtrongjit T., Wuthikanun V., Amornchai P., Newton P., Phetsouvanh R., Day N.P., Roatrakul S. Whole cell matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification of *Leptospira* spp. in Thailand and Lao PDR. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019; 13(4):e0007232. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007232.
20. Zueva E.V., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Totolian Ar.A. MALDI-TOF mass spectrometric analysis of *Leptospira* spp. strains used in serodiagnosis of leptospirosis. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii. [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2015; 6:28–36.
21. Rettinger A., Krupka I., Grünwald K., Dyachenko V., Fingerle V., Konrad R., Raschel H., Busch U., Sing A., Straubinger R.K., Huber I. *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiol.* 2012; 12:185. DOI: 10.1186/1471-2180-12-185.
22. Tomachewski D., Galvão C.W., de Campos Júnior A., Guimarães A.M., Ferreira da Rocha J.C., Etto R.M. Ribopeaks: a web tool for bacterial classification through m/z data from ribosomal proteins. *Bioinformatics.* 2018; 34 (17): 3058–3060. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty215.
23. Alnakip M.E., Rhouma N.R., Abd-Elfatah E.N., Quintela-Baluja M., Böhme K., Fernández-No I., Barros-Velázquez J. Discrimination of major and minor streptococci incriminated in bovine mastitis by MALDI-TOF MS fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing. *Res. Vet. Sci.* 2020; 132: 426–438. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.07.027.
24. El-Jeni R., Böhme K., El Bour M., Calo-Mata P., Kefi R., Barros-Velázquez J., Bouhaouala-Zahar B. Rapid genus identification of selected lactic acid bacteria isolated from *Mugil cephalus* and *Oreochromis niloticus* organs using MALDI-TOF. *Ann. Microbiol.* 2019; 69(1):1–15. DOI: 10.1007/s13213-018-1357-8.
25. Torres-Corral Y., Fernández-Alvarez C., Santos Y. Proteomic and molecular fingerprinting for identification and tracking of fish pathogenic *Streptococcus*. *Aquaculture.* 2019; 498:322–334. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.041.
26. Christoforidou S., Kyritsi M., Boukouvala E., Ekateriniadou L., Zdragias A., Samouris G., Hadjichristodoulou C. Identification of *Brucella* spp. isolates and discrimination from the vaccine strain Rev. 1 by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mol. Cell. Prob.* 2020; 51:101533. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101533.
27. Kyritsi M.A., Kristo I., Hadjichristodoulou C. Serotyping and detection of pathogenecity loci of environmental isolates of *Legionella pneumophila* using MALDI-TOF MS. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2020; 224:113441. DOI: 10.1016/j.ijheh.2019.113441.
28. Torres I., Giménez E., Vinuesa V., Pascual T., Moya J.M., Alberola J., Martínez-Sapiña A., Navarro D. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) proteomic profiling of cerebrospinal fluid in the diagnosis of enteroviral meningitis: a proof-of-principle study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 37(12):2331–2339. DOI: 10.1007/s10096-018-3380-x.
29. Martina P., Leguizamon M., Prieto C.I., Sousa S.A., Montanaro P., Draghi W.O., Stämmler M., Bettoli M., de Carvalho C.C.C.R., Palau J., Figoli C., Alvarez F., Benetti S., Lejona S., Vescina C., Ferreras J., Lasch P., Lagares A., Zorreguieta A., Leitão J.H., Yantorno O.M., Bosch A. *Burkholderia puraque* sp. nov., a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018; 68(1):14–20. DOI: 10.1099/ijsem.0.002293.
30. Blumenschein C., Pfeifer Y., Werner G., John C., Schneider A., Lasch P., Doellinger J. Unbiased antimicrobial resistance detection from clinical bacterial isolates using proteomics. *bioRxiv.* 2020. DOI: 10.1101/2020.11.17.386540.
31. Dieckmann R., Hammerl J.A., Hahmann H., Wicke A., Kleta S., Dabrowski P.W., Nitsche A., Stämmler M., Al Dahouk S., Lasch P. Rapid characterization of *Klebsiella oxytoca* isolates from contaminated liquid hand soap using mass spectrometry, FTIR and Raman spectroscopy. *Faraday Discuss.* 2016; 187:353–75. DOI: 10.1039/c5fd00165j.
32. Daumas A., Alingrin J., Ouedraogo R., Villani P., Leone M., Mege J.-L. MALDI-TOF MS monitoring of PBMC activation status in sepsis. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1):355. DOI: 10.1186/s12879-018-3266-7.
33. Lasch P., Wahab T., Weil S., Pályi B., Tomaso H., Zange S., Kiland Granerud B., Drevinek M., Kokotovic B., Wittwer M., Pfütter V., Di Caro A., Stämmler M., Grunow R., Jacob D. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: results of an interlaboratory ring trial. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(8):2632–2640. DOI: 10.1128/JCM.00813-15.
34. Cheng W.C., Jan I.S., Chen J.M., Teng S.H., Teng L.J., Sheng W.H., Hsueh P.R. Evaluation of the Bruker Biotype matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Vibrio* species. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(5):1741–1744. DOI: 10.1128/JCM.00105-15.
35. Rychert J., Creely D., Mayo-Smith L.M., Calderwood S.B., Ivers L.C., Ryan E.T., Boney J., Qadri F., Ahmed D., Ferraro M.J., Harris J.B. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(1):329–331. DOI: 10.1128/JCM.02666-14.
36. Balakhonov S.V., Mironova L.V., Afanas'ev M.V., Kulikalova E.S., Ostyak A.S. MALDI-TOF mass-spectrometric determination of the species of pathogens in improving the epidemiological surveillance of dangerous infectious diseases. *Bakteriologiya. [Bacteriology]*. 2016; 1 (1): 88–94. DOI: 10.20953 / 2500-1027-2016-1-88-94.
37. Mironova L.V., Basov E.A., Afanas'ev M.V., Khunkheeva Zh.Yu., Mitkeeva S.K., Ganin V.S., Urbanovich L.Ya., Kulikalova E.S., Gol'dapel' E.G., Balakhonov S.V. MALDI-TOF mass spectrometric analysis with molecular-genetic identification of *Vibrio*

- spp.*, in the system for monitoring of vibrio flora of surface water bodies. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2014; 19 (6): 27–36.
38. Afanas'ev M.V., Ostyk A.S., Balakhonov S.V. Approbation of mass spectrometry with matrix-activated laser desorption / ionization for identification of the plague pathogen. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2014; 8: 39–43.
39. Wittwer M., Heim J., Schär M., Dewarrat G., Schürch N. Tapping the potential of intact cell mass spectrometry with a combined data analytical approach applied to *Yersinia* spp.: detection, differentiation and identification of *Y. pestis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 2011; 34(1):12–19. DOI: 10.1016/j.syapm.2010.11.006.
40. Rouffaer L.O., Baert K., Van den Abeele A.M., Cox I., Vanantwerpen G., De ZutterL., Strubbe D., Vranckx K., Lens L., Haesbrouck F., Delmée M., Pasmans F., Martel A. Low prevalence of human enteropathogenic *Yersinia* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in Flanders. *PLoS One*. 2017; 12(4):e0175648. DOI: 10.1371/journal.pone.0175648.
41. Guliev R.R., Suntsova A.Y., Vostrikova T.Y., Shchegolikhin A.N., Popov D.A., Guseva M.A., Shevelev A.B., Kurochkin I.N. Discrimination of *Staphylococcus aureus* strains from coagulase-negative staphylococci and other pathogens by Fourier transform infrared spectroscopy. *Anal. Chem.* 2020; 92(7):4943–4948. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05050.
42. Cuénod A., Foucault F., Pflüger V., Egli A. Factors associated with MALDI-TOF mass spectral quality of species identification in clinical routine diagnostics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11: 646648. DOI: 10.3389/fcimb.2021.646648.
43. Morel F., Jacquier H., Desroches M., Fihman V., Kumanski S., Cambau E., Decousser J.W., Berçot B. Use of Andromas and Bruker MALDI-TOF MS in the identification of *Neisseria*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 37(12):2273–2277. DOI: 10.1007/s10096-018-3368-6.
44. Lasch P., Drevinek M., Nattermann H., Grunow R., Stämmler M., Dieckmann R., Schwecke T., Naumann D. Characterization of *Yersinia* using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. *Anal. Chem.* 2010; 82(20):8464–8475. DOI: 10.1021/ac101036s.
45. Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyk A.S., Vityazeva S.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Ivzhenko N.I., Rozhdestvensky E.N., Viskov E.N., Fomina L.A. The first case of *Yersinia pestis* subsp. *pestis* isolation in the territory of Altai mountain natural plague focus. Communication 1. Microbiological characteristics, molecular-genetic and mass-spectrometric identification of the isolate. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii. [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (1):60–65. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-60-65.
46. Eddabra R., Prévost G., Scheftel J.M. Rapid discrimination of environmental *Vibrio* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol. Res.* 2012; 167(4):226–230. DOI: 10.1016/j.micres.2011.09.002.
47. Emami K., Askari V., Ullrich M., Mohinudeen K., Anil A.C., Khandeparker L., Burgess J.G., Mesbahi E. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry. *PloS One*. 2012; 7(6):e38515. DOI: 10.1371/journal.pone.0038515.
48. López-Ramos I., Hernández M., Rodríguez-Lázaro D., Gutiérrez M.P., Zarzosa P., Orduña A., March G.A. Quick identification and epidemiological characterization of *Francisella tularensis* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*. 2020; 177:106055.
49. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Spletstoesser W.D. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1061–9. DOI: 10.1128/JCM.01953-09.
50. Müller W., Hotzel H., Otto P., Karger A., Bettin B., Bocklisch H., Braune S., Eskens U., Hörmansdorfer S., Konrad R., Nesselner A., Peters M., Runge M., Schmoock G., Schwarz B.A., Sting R., Myrtennäs K., Karlsson E., Forsman M., Tomaso H. German *Francisella tularensis* isolates from European brown hares (*Lepus europaeus*) reveal genetic and phenotypic diversity. *BMC Microbiol.* 2013; 13:61. DOI: 10.1186/1471-2180-13-61.
51. Ul'shina D.V., Eremenko E.I., Kovalev D.A., Ryazanova A.G., Kuznetsova I.V., Aksanova L.Yu., Semenova O.V., Bobrysheva O.V., Siritsa Yu.V., Kulichenko A.N. Revealing the features of mass spectra of protein extracts of spore and vegetative forms of anthrax pathogen using time-of-flight mass spectrometry. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii. [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2018; 6: 66–72. DOI: 10.36233 / 0372-9311-2018-6-66-72.
52. Ul'shina D.V., Kovalev D.A., Bobrysheva O.V., Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Kovaleva N.I., Kulichenko A.N. The use of time-of-flight mass spectrometry for the diagnosis of brucellosis and inter-specific differentiation of *Brucella* spp. *Infektsionnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie. [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2018; 7(4):15–24. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-14002.

Authors:

Ульшина Д.В., Kovalev D.A., Kuznetsova I.V., Bobrysheva O.V., Krasovskaya T.L., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355000, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Ульшина Д.В., Kovalev D.A., Кузнецова И.В., Бобрышева О.В., Красовская Т.Л., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российской Федерации. 355000, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ Original articles

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-51-59

УДК 616.98:579.852.11(571.63)

**З.Ф. Дугаржапова¹, М.А. Ивачева¹, М.В. Чеснокова¹, Е.В. Кравец¹, Е.А. Решетняк², Д.Ю. Кузин³,
А.А. Уманец³, Т.Н. Детковская², С.В. Балахонов¹**

СИБИРСКАЯ ЯЗВА В ПРИМОРСКОМ КРАЕ (1919–2020 гг.). СООБЩЕНИЕ 1. ИСТОРИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА СТАЦИОНАРНО НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ ПО СИБИРСКОЙ ЯЗВЕ ПУНКТОВ

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российской Федерации; ²Управление Роспотребнадзора по Приморскому краю, Владивосток, Российской Федерации;

³Государственная ветеринарная инспекция Приморского края, Владивосток, Российской Федерации

Цель исследования – анализ состояния стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Приморского края и актуализация Кадастра стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП) Российской Федерации (2005 г.). Материалы и методы. Проведен сбор и анализ учетных и отчетных документов, архивных и информационных материалов, сведений по сибирской язве учреждений ветеринарии, Роспотребнадзора, муниципальных образований по учтенным 72 СНП Приморского края. Использованы Справочник населенных пунктов РСФСР, неблагополучных по сибирской язве (1976 г.), Кадастр СНП РФ (2005 г.). **Результаты и обсуждение.** Описание случаев сибирской язвы на территории Приморского края начинается с 1894 г., официальная регистрация болезни – с 1919 г. Последние случаи заболеваний сельскохозяйственных животных и людей отмечены в 1979 г. в Кавалеровском и Октябрьском районах. При актуализации Кадастра СНП РФ (2005 г.) уточнены сведения по 82 неманифестным пунктам края в 22 муниципальных и 6 городских образованиях (районах). В шести районах края сибирская язва официально не регистрировалась. Большинство СНП сосредоточены на Приханкайской равнине, где сконцентрированы сеть транспортных магистралей, наибольшее количество поголовья скота и численность населения. Сведения о количестве заболевших животных и людей за 1919–1929 гг. не сохранились, и в период 1980–2020 гг. сибирская язва в крае не отмечалась. За 1929–1979 гг. в Приморье зарегистрированы заболевания сибирской язвой 173 голов животных и 34 человек. Высокая эпизоотическая активность отмечалась в период 1919–1941 гг. В азиатской части РФ Приморский край относится к территориям средней степени эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия по сибирской язве. Мониторинг сибирской язвы показал, что сохранению возбудителя в почвах десяти районов края могут способствовать отсутствие токсичности почвы (86,8 %) и средняя питательность (23,5 %) по отношению к сибируезвенному микробу.

Ключевые слова: сибирская язва, стационарно неблагополучный по сибирской язве пункт, Кадастр СНП РФ, Приморский край.

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

Для цитирования: Дугаржапова З.Ф., Ивачева М.А., Чеснокова М.В., Кравец Е.В., Решетняк Е.А., Кузин Д.Ю., Уманец А.А., Детковская Т.Н., Балахонов С.В. Сибирская язва в Приморском крае (1919–2020 гг.). Сообщение 1. Исторические сведения и характеристика стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 3:51–59. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-51-59.

Поступила 14.04.2021. Отправлена на доработку 11.06.2021. Принята к публ. 16.06.2021.

**Z.F. Dugarzhapova¹, M.A. Ivacheva¹, M.V. Chesnokova¹, E.V. Kravets¹, E.A. Reshetnyak²,
D.Yu. Kuzin³, A.A. Umanets³, T.N. Detkovskaya², S.V. Balakhonov¹**

Antrax in Primorsky Territory (1919–2020). Communication 1. Historical Records and Characteristics of Stationary Potentially Hazardous as Regards Anthrax Areas

¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation;

²Rospotrebnadzor Administration in the Primorsky Territory, Vladivostok, Russian Federation;

³State Veterinary Inspectorate of the Primorsky Territory, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to analyze the state of stationary potentially hazardous areas as regards anthrax in the Primorsky Territory and update the Cadastre of stationary potentially hazardous as regards anthrax areas (SPHA) of the Russian Federation (2005). **Materials and methods.** The collection and survey of accounting and reporting documents, archival and informational materials, records on anthrax from veterinary institutions, Rospotrebnadzor, municipalities by the 72 registered anthrax SPHA of the Primorsky Territory have been carried out. The reference book of the Russian Soviet Federative Socialist Republic's settlements endemic for anthrax (1976), the Cadastre of the stationary potentially hazardous as regards anthrax areas in the Russian Federation (2005) were used. **Results and discussion.** The description of anthrax cases in the Primorsky Territory goes back to 1894, the official registration of the disease – since 1919. The last cases of the disease in farm animals and population were noted in Kavalerovsky and Oktyabrsky districts in 1979. When updating the SPHA (2005), information on 82 dormant sites of the Territory in 22 municipal and six urban districts was clarified. In six districts of the Territory, anthrax was not officially registered. Most of the SPHAs are centered on the Khanka plain, where the network of transport routes, the largest number of livestock and population are concentrated. The data on the number of sick animals and people over a period of 1919–1929 have not survived, and in

the period between 1980 and 2020 anthrax was not reported in the region. 173 animals and 34 humans were diagnosed with anthrax in 1929–1979 in Primorye. High epizootic activity was noted in the period of 1919–1941. In the Asian part of the Russian Federation, Primorsky Territory belongs to the regions under a mild epizootic and epidemiological disadvantage as regards anthrax. Monitoring of anthrax has shown that the persistence of the pathogen in the soils of ten districts of the Territory could be facilitated by the absence of soil toxicity (86,8 %) and an average nutritional value (23,5 %) in relation to the anthrax microbe.

Key words: anthrax, stationary potentially hazardous as regards anthrax area, Cadastre of SPHA in RF, Primorsky Territory.

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

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

Citation: Dugarzhapova Z.F., Ivacheva M.A., Chesnokova M.V., Kravets E.V., Reshetnyak E.A., Kuzin D.Yu., Umanets A.A., Detkovskaya T.N., Balakhonov S.V. Antrax in Primorsky Territory (1919–2020). Communication 1. Historical Records and Characteristics of Stationary Potentially Hazardous as Regards Anthrax Areas. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:51–59. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-51-59.

Received 14.04.2021. Revised 11.06.2021. Accepted 16.06.2021.

Dugarzhapova Z.F., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5315-4797>
Ivacheva M.A., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3794-5337>
Chesnokova M.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5489-9363>

Kravets E.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7194-6413>
Balakhonov S.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

В Российской империи за период 1885–1900 гг. от сибирской язвы пало около 900 тыс. голов скота, а в 1900–1912 гг. количество павших животных снизилось до 48 тыс. По данным Министерства внутренних дел, за 1896–1900 гг. сибирской язвой заболели 53333 человека [1, 2]. На восточных рубежах империи сибирскую язву начали регистрировать во второй половине XIX столетия, что связано с геополитическими событиями, повлекшими изменения государственной границы страны с Японией и Китаем по Русско-японскому (1855 г.), Айгуньскому (1858 г.) и Пекинскому (1860 г.) договорам. К концу XIX в. активное освоение новых территорий Российской империи, развитие горнодобывающей промышленности Приморской области, разработка месторождений полезных ископаемых, а также растущий товарооборот с Японией и Китаем потребовали совершенствования наземного транспортного сообщения с европейской частью страны. Это реализовалось в виде грандиозного проекта по строительству Транссибирской железнодорожной магистрали, соединяющей Запад и Восток страны [3]. В 1891–1894 гг. проложена Южно-Уссурийская железная дорога от Владивостока до ст. Муравьев-Амурский (ныне п. Лазо), через три года завершен северный участок до Хабаровска, а в 1897 г. открыто временное движение от Владивостока до Хабаровска [4].

В 1922–1925 гг. на востоке страны образована Дальневосточная область, которая в январе 1926 г. преобразована в Дальневосточный край, объединивший четыре ранее существовавшие губернии (Амурсскую, Забайкальскую, Камчатскую и Приморскую, включая северный Сахалин). В 1938 г. Указом Президиума Верховного Совета СССР Дальневосточный край разделен на Хабаровский и Приморский края. Важно отметить, что в 30-е годы XX века начались интенсивная коллективизация сельского хозяйства и индустриализация страны, которые привели к миграции на Дальний Восток жителей сибирских и западных районов Советского Союза. После окончания Второй мировой войны край развивался как крупный

промышленно-аграрный район Дальнего Востока, значительную роль в экономике которого играл морской и железнодорожный транспорт. На западе Приморский край граничит с Китайской Народной Республикой, а на юго-западе – с Корейской Народно-Демократической Республикой. По данным Министерства транспорта РФ на январь 2020 г., в крае функционируют 16 международных пунктов пропуска через государственную границу, в том числе аэропорт Кневичи, 6 автомобильных, 8 морских и железнодорожный – станция Хасан [5].

Для оперативного межведомственного взаимодействия при локализации и ликвидации спорадических случаев, вспышек сибирской язвы, мониторинга неблагополучных пунктов и предупреждения формирования новых почвенных очагов инфекции в РФ постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 12.12.2016 № 180 «О дополнительных мероприятиях, направленных на профилактику сибирской язвы в Российской Федерации» и решением рабочего совещания учреждений Роспотребнадзора по проблеме сибирской язвы (Ставрополь, 25 марта 2019 г.) предложено провести актуализацию Кадастра стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации (СНП РФ) (2005 г.) для создания единой электронной базы данных с использованием геоинформационных систем.

Цель работы – анализ состояния стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Приморского края для актуализации Кадастра стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации (СНП РФ) (2005 г.).

Материалы и методы

Проведен сбор и анализ учетных и отчетных документов, архивных и информационных материалов, сведений по сибирской язве, стационарно неблагополучным по сибирской язве пунктам Государственной ветеринарной инспекции Приморского края, КГБУ «Краевая ве-

теринарная противоэпизоотическая служба», Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю, ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора, муниципальных образований и районов Приморского края. В работе использованы Справочник населенных пунктов РСФСР, неблагополучных по сибирской язве (1976 г.), Кадастр СНП РФ (2005 г.) [6, 7]. Работа по уточнению сведений и поиску архивных материалов по СНП Приморского края выполнена институтом во взаимодействии с учреждениями Краевой ветеринарной службы, Управлением Роспотребнадзора по Приморскому краю. Территория Приморского края распределена на 12 городских (ГО) и 8 муниципальных округов (МО), 14 муниципальных районов (МР), которые утверждены в соответствии с Законом Приморского края от 14.11.2001 № 161-КЗ «Об административно-территориальном устройстве Приморского края» и приложением «Реестр административно-территориальных и населенных пунктов края». Распределение количества СНП, заболеваний животных и людей, расчеты показателей проведены с учетом настоящего административно-территориального деления края.

Результаты и обсуждение

Первые документально подтвержденные случаи сибирской язвы на территории Приморского края зарегистрированы в 1894 г., когда при строительстве Уссурийской железной дороги Транссибирской магистрали заболели 2647 и пали 2204 лошади [8, 9]. Возникновению эпизоотии сибирской язвы среди лошадей во время строительства дороги способствовали скопление большого количества животных и отсутствие ветеринарного контроля за больными и павшими животными. Сибирская язва продвигалась с юга на север вместе со строительством железной дороги и с запада на восток вместе с закупаемыми рабочими лошадьми из Китая и Кореи [8, 9].

Во время Русско-японской войны (январь 1904 – август 1905 г.) на Дальнем Востоке произошла крупная вспышка сибирской язвы. В середине 1904 г. болезнь внезапно распространилась в действующей армии. За две недели от сибирской язвы пали около 2000 лошадей и погибли 30 человек. Н.К. Розенбергом (1938) отмечено, что в период войны с Японией наблюдались 976 случаев болезни военнослужащих, клинические проявления сибирской язвы у них были локализованы в лобной области головы и затылочной части шеи [10]. При сопоставлении сроков болезни людей и эпизоотий в этой губернии установлено, что заболевания в воинских частях были обусловлены контаминацией возбудителем сибирской язвы сырья (овчин), поступавшего из Сибири и Юго-Восточной России, а затем – готовых полуфабрикатов с шубно-овчинных заводов Вятской губернии на Дальний Восток [11].

Официальная регистрация сибирской язвы в

Приморском крае, согласно данным Справочника населенных пунктов РСФСР, неблагополучных по сибирской язве (1976 г.), и Кадастра СНП РФ (2005 г.), началась в 1919 г. в с. Борисовка Уссурийского района, где зарегистрирована эпизоотия крупного рогатого скота (КРС). Повторные случаи болезни среди животных отмечались в этом селе в 1937, 1938 и 1941 гг. [6, 7]. В 1997 г. по экстенсивности эпизоотического процесса сибирской язвы на территории Советского Союза Приморский край отнесен к зоне спорадического проявления [1]. В азиатской части РФ за 36-летний период наблюдения (1985–2020 гг.) Приморский край включен в группу территорий средней степени эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия по сибирской язве, как и Республики Саха (Якутия) и Хакасия, Красноярский край, Иркутская и Тюменская области. Последние случаи заболевания людей отмечены в 1979 г. в Кавалеровском и Октябрьском районах края.

Характеристика СНП

По данным Справочника населенных пунктов РСФСР, неблагополучных по сибирской язве (1976 г.), и Кадастра СНП РФ (2005 г.), в Приморском крае были учтены 72 неманифестных СНП в 17 и 19 районах края соответственно [6, 7]. В архивных материалах Иркутского противочумного института (1980 г.) за период с 1926 по 1979 год сибирская язва зарегистрирована в 69 СНП.

При проведении актуализации Кадастра СНП РФ (2005 г.) на основании официальных сведений Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю и Приморской краевой ветеринарной инспекции, архивных материалов муниципальных учреждений края, в настоящее время уточнены сведения по 82 СНП в 22 муниципальных и 6 городских образованиях (районах) из 39 (22 административных района и округа, 5 внутригородских районов Владивостока и 12 городов краевого подчинения). В шести муниципальных образованиях края (Дальнегорский ГО, Кировский МР, Лазовский МО, Ольгинский МР, Тернейский МО, Чугуевский МО) за весь 102-летний период наблюдения сибирская язва официально не регистрировалась. За период 1919–1979 гг., согласно актуализированным сведениям и данным Приморской государственной ветеринарной инспекции, КГБУ «Приморская ветеринарная служба» и Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю, в крае отмечены заболевания сибирской язвой 173 голов сельскохозяйственных животных (СХЖ) и 34 человек с пятью летальными исходами (табл. 1).

На основании архивных сведений Приморской краевой ветеринарной инспекции и Государственного архива Приморского края, обновленный список Кадастра пополнен 18 СНП в 12 муниципальных районах; установлена территориальная принадлежность 2 пунктов между 4 районами; объединены 4 пункта в 2 СНП, установлены сведения об 1 СНП, обозначенном без данных.

Таблица 1 / Table 1

**Количество СНП, зарегистрированных случаев сибирской язвы среди СХЖ и людей в Приморском крае (1919–2000 гг.
с актуализацией данных на 2020 г.)**

**The number of stationary potentially hazardous as regards anthrax areas (SPHA), reported cases of anthrax among farm animals and humans
in the Primorsky Territory between 1919 and 2000 with updated data for 2020**

Административный район Administrative district	Кол-во СНП Number of SPHA		Сведения об эпизоотической активности СНП Information on the epizootic activity of SPHA		Заболевания людей/Умерли Human cases/deaths	Заболевания СХЖ, голов Diseases in farm animals, livestock units				
	Кадастр СНП Cadastre of SPHA	актуал. updated	кол-во проявлений number of manifestations	годы periods, years		KPC cattle	свиньи pigs	лошади horses	др. others	всего total
Артемовский Artemovsky	-	1	2	1954–1957	-	9	-	-	-	9
Анучинский Anuchinsky	3	5	6	1932–1977	2	1	-	1	-	2
Дальнереченский Dalnerechensky	6	6	11	1936–1947	1/1	7	-	-	-	7
Кавалеровский Kavalerovsky	1	1	1	1979	3	1	-	-	-	1
Краевой центр Владивостокский Territorial Center Vladivostoksky	3	1	3	1946–1949	-	2	-	-	-	2
Красноармейский Krasnoarmeysky	1	1	1	1945	-	-	-	1	-	1
Лесозаводский Lesozavodsky	1	1	5	1940–1961	1/1	6	-	1	-	7
Михайловский Mikhailovsky	6	5	8	1930–1951	1	6	-	3	-	9
Надеждинский Nadezhdinsky	1	1	3	1947–1968	-	3	-	-		3
Октябрьский Oktyabr'sky	3	3	4	1932–1979	9/1	5	-	-	-	5
Партизанский Partizansky	-	1	1	1958	-	2	1	-		3
Пограничный Pogranichny	-	1	1	1958	-		-	1	-	1
Пожарский Pozharsky	3	6	10	1928–1939	-	2	-	-	-	2
Спасский Spassky	12	13	32	1933–1948	-	36	2	13	-	51
Уссурийский Ussuriysky	9	10	21	1919–1973	-	4	2	-	-	6
Ханкайский Khankaisky	5	4	12	1931–1938	-	11	3	11	-	25
Хасанский Khasansky	1	2	2	1938, 1940	-		-	3	-	3
Хорольский Khorolsky	8	9	11	1933–1940	-	1	-	8	1 н/у n/s	10
Фокино Fokino	-	1	1	1953	-		-	1	-	1
Черниговский Chernigovsky	7	7	15	1931–1953	2	10	-	4	-	14
Шкотовский Shkotovsky	-	2	2	1939, 1955	-	2	-	-	-	2
Яковлевский Yakovlevsky	1	1	1	1977	15	7	-	2	-	9
Без данных No data available	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Итого Total</i>	72	82	153	58	34/5	115	8	49	1	173

Примечание: н/у – не указан.

Note: n/s – not specified.

В журнале эпизоотического состояния Артемовского района указано, что в 1954 г. заболели восемь голов КРС в районе Красных Казарм г. Артем и в 1957 г. – одна голова КРС в с. Угловое. Два вышеназванных пункта Артемовского района в настоящее время являются жилыми районами г. Артем, следовательно, объединены нами в один пункт в соответствии с современным административно-территориальным делением края.

При сопоставлении данных Справочника (1976 г.) в Анучинском районе к трем учтенным в Кадастре СНП РФ (2005 г.) добавлены два СНП, болезнь отмечалась в с. Берестовец в 1932 г. и с. Шекляево в 1938 г. Сведения по г. Лесозавод (г. Лесозаводск), указанные в строке Кадастра «Краевой центр Приморского края», при создании базы данных СНП выделены в отдельное административное образование ГО Лесозаводск.

В журнале эпизоотического состояния Партизанского района указано, что в 1958 г. заболели и пали две головы КРС и одна свинья в с. Владимира-Александровское (ранее с. Буденовка). В этом же году в колхозе «Заря коммунизма» с. Барановка Пограничного района пала одна лошадь. В настоящее время бывший населенный пункт Барановка входит в состав села Барано-Оренбургское, соответственно, последнее взято на учет и включено в список актуализированных пунктов.

При ревизии Кадастра СНП РФ (2005 г.) специалистами Управления Роспотребнадзора по Хабаровскому краю переданы сведения о трех населенных пунктах (д. Тихоновка (с 1939 г. с. Пожарское), д. Уфимовка, с. Никитовка), которые в настоящее время находятся на территории Пожарского района Приморского края согласно Указу Президиума Верховного Совета СССР от 22.10.1938. Сибирская язва в этих селах регистрировалась в 1928–1933 гг. В ложе Лучегорского водохранилища при строительстве Приморской ГРЭС в 1974 г. затоплено СНП Благовещенка, жители села переселены выше в новый одноименный населенный пункт.

Проявления сибирской язвы в селах Вознесенка (1934 г.) Хорольского и Степное (1973 г.) Уссурийского районов, учтенные в журналах эпизоотического состояния и регистрации неблагополучных по сибирской язве пунктов ветеринарных станций двух районов, ранее не указаны в Кадастре СНП РФ (2005 г.). По данным эпизоотического журнала Хасанского района, в колхозе «30 лет Октября» (на данный момент с. Цуканово) в 1938 г. пала одна лошадь. В с. Алтыновка Черниговского района в 1936 г. пала одна голова КРС. Из эпизоотического журнала Шкотовского района установлено, что в 1939 г. в пгт Шкотово и в 1955 г. в пгт Смоляниново заболели и пали по одной голове КРС. В совхозе Путятинский на острове Путятина в 1953 г. пала одна лошадь (ныне пгт Путятин в составе ЗАТО Фокино). Изначально населенные пункты, ныне входящие в ЗАТО Фокино, относились к муници-

пальному образованию Шкотовского района и до образования городского округа имели с ним общую историю.

Расширение границ населенных пунктов привело к слиянию ряда сел и вхождению их в состав городов. В краевом центре Владивостоке сибирская язва отмечалась в 1946 и 1948–1949 гг., причем в 1946 г. в подсобном хозяйстве склада НКО № 187 и в 1948 г. на ст. Океанская заболели по одной голове КРС. Проявление сибирской язвы в 1949 г. в строке Кадастра «нет данных Владивостокская», вероятно, повторяет событие во Владивостоке.

В Кадастре СНП РФ (2005 г.) были учтены колхозы и совхозы, ликвидированные в 1990-е гг., на данный момент их местоположения прикреплены к географическим координатам населенных пунктов – бывших центральных усадьб. В Михайловском районе актуализированы сведения по пяти пунктам, два из которых – совхоз Дубининский и с. Некруглово – объединены в одноименное село. Административная реорганизация районов края привела к изменению территориальной принадлежности двух пунктов: Кнорринг Черниговского (ныне Спасского) и Сиваковка Ханкайского (ныне Хорольского) районов; при этом последнее село дублировалось в списке СНП двух районов.

Ареал сибирской язвы простирается в западной, юго-западной и центральной частях края. Картирование территориального распределения СНП показало их сосредоточенность на Приханкайской равнине, что обусловлено большой концентрацией населения, транспортных магистралей и, соответственно, преобладанием скота в этой части края (рис. 1). По итогам актуализации данных Кадастра СНП РФ (2005 г.) наибольшее количество СНП учтено в восьми районах: Спасском (13), Уссурийском (10), Хорольском (9), Черниговском (7), Дальнереченском (6), Пожарском (6), Анучинском (5) и Михайловском (5). В Ханкайском районе насчитывается четыре СНП, Октябрьском – три, Хасанском и Шкотовском – по два, в остальных десяти – по одному неблагополучному пункту. В шести административных образованиях края (Дальнегорский ГО, Кировский, Лазовский, Ольгинский, Тернейский и Чугуевский МР) СНП отсутствуют. За 36-летний период наблюдения (1985–2020 гг.) все СНП края являются неманифестными.

По показателям плотности СНП (кол-во СНП/тыс. кв. км) районов края в сравнении с краевым, равным 0,49/тыс. кв. км, территорию края можно разделить на три группы (рис. 2).

К первой группе с высокой плотностью (0,81–4,57/тыс. кв. км), превышающей от 2,3 до 9,3 раза краевой показатель, относятся 13 муниципальных образований и районов: Хорольский МО, Черниговский МР, Спасский МР (включая Спасский ГО), Уссурийский ГО, Михайловский МР, краевой центр (Владивостокский ГО), Октябрьский МО, Ханкайский МО, Анучинский МО и Шкотовский

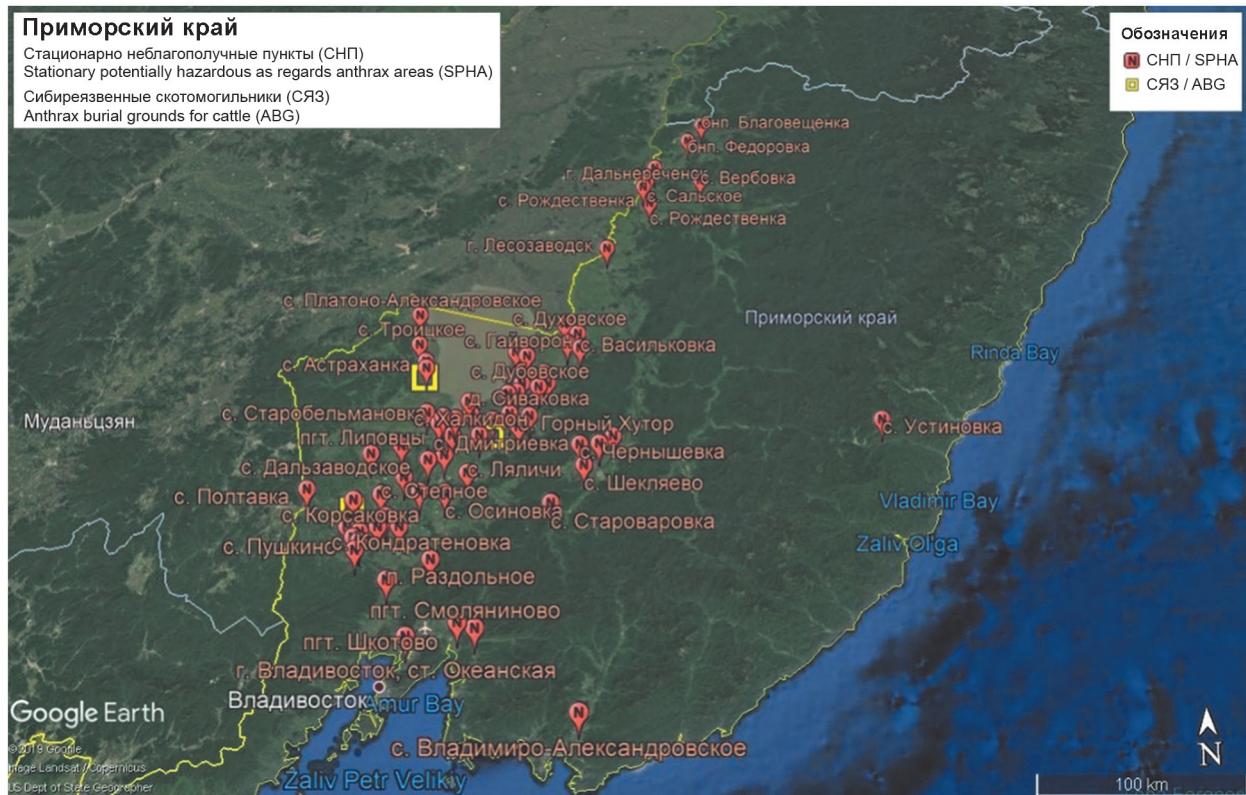


Рис. 1. Расположение стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов и сибиризанных захоронений на территории Приморского края

Fig 1. The distribution of the stationary potentially hazardous as regards anthrax areas and anthrax burials on the territory of Primorsky Territory

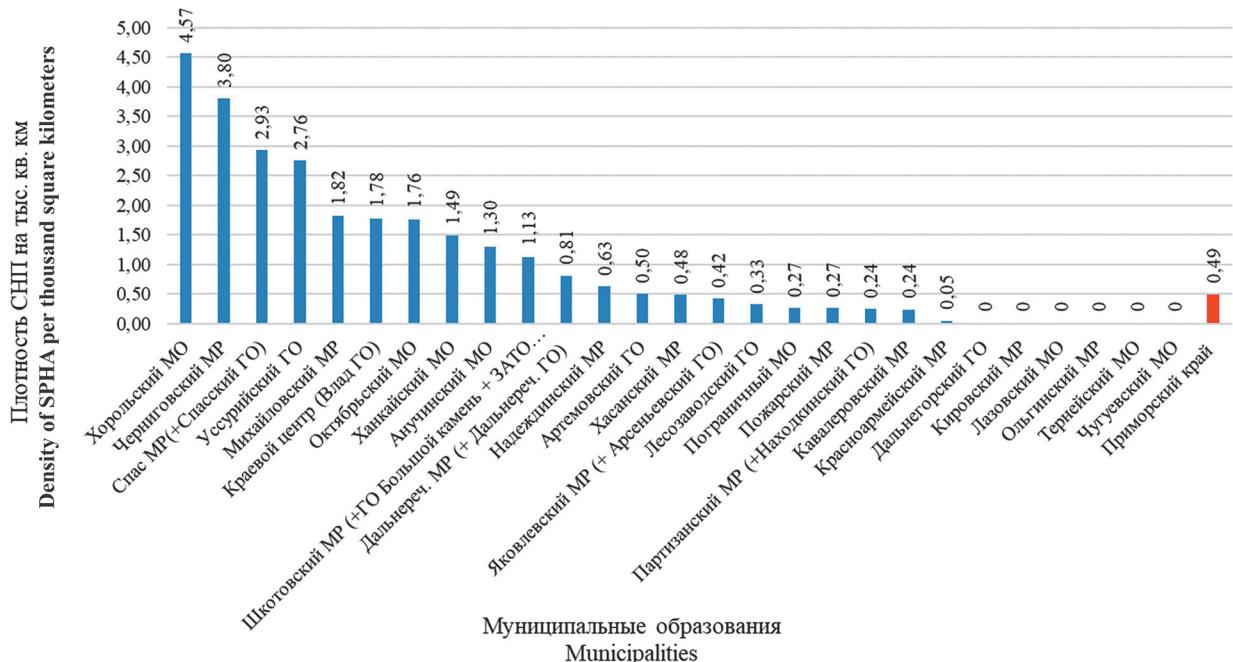


Рис. 2. Распределение муниципальных образований и районов Приморского края по плотности СНП на тыс. кв. км

Fig. 2. Distribution of municipalities and districts of Primorsky Territory by density of SPHAs as regards anthrax per thousand square kilometers

МР (+ГО Большой камень + ЗАТО Фокино).

Во вторую группу (0,42–0,05/тыс. кв. км), с разницей от 0,1 до 1,3 раза по отношению к краевому показателю, вошли 14 муниципальных об-

разований и районов: Дальнереченский МР (включая Дальнереченский ГО), Надеждинский МР, Артемовский ГО, Хасанский МР, Яковлевский МР (включая Арсеньевский ГО), Лесозаводский ГО,

Пограничный МО, Пожарский МР, Партизанский МР (включая Находкинский ГО), Кавалеровский МР и Красноармейский МР.

В третьей группе (0) – шесть районов, где отсутствуют зарегистрированные случаи сибирской язвы и нет учтенных СНП: Дальнегорский ГО, Кировский МР, Лазовский МО, Ольгинский МР, Тернейский МО, Чугуевский МО.

Многократные эпизоотические проявления сибирской язвы, согласно данным Кадастра СНП РФ (2005 г.), отмечались в г. Лесозаводске и с. Воскресенка Спасского района. Данные Кадастра по г. Лесозаводску Лесозаводского ГО о 21-кратной регистрации болезни в период 1942–1961 гг. не были удостоверены архивными материалами Государственной ветеринарной инспекции Приморского края. В Журнале записи эпизоотического состояния КГБУ «Лесозаводская ветеринарная станция по борьбе с болезнями животных» имеются сведения о пятикратной регистрации сибирской язвы и заболевании сибирской язвой всего шести голов КРС и одной лошади в г. Лесозаводске: в 1940 г. (одна голова КРС), 1942 г. (одна лошадь), 1947 г. (три головы КРС), 1948 и 1961 гг. (по одной голове КРС). Также известно, что диагноз «сибирская язва» у людей не подтвердился. Пятнадцатикратная регистрация сибирской язвы (1933–1948 гг.) в с. Воскресенка Спасского района, согласно Кадастру, также не получила документального подтверждения. По сведениям эпизоотического журнала КГБУ «Спасская станция по борьбе с болезнями животных», случаи сибирской язвы в с. Воскресенка отмечались трехкратно в 1934, 1935 и 1948 гг. В 1934 г. заболели шесть лошадей, в 1935 г. – четыре головы КРС, в 1948 г. – одна голова КРС и две свиньи.

При актуализации Кадастра СНП данные уточнены согласно эпизоотическим журналам районных ветеринарных станций по борьбе с болезнями животных КГБУ «Краевая ветеринарная противоэпизоотическая служба». При оценке эпизоотической активности СНП по кратности проявлений установлено, что наиболее высокая активность наблюдалась в двух пунктах, где сибирская язва среди животных регистрировалась шестикратно, – г. Дальнереченск (см. выше) и г. Спасск-Дальний (1933–1938 гг.). Пятикратно болезнь отмечалась в 3 СНП – г. Лесозаводск, г. Уссурийск (1936–1938, 1944, 1949 гг.) и с. Прохоры Спасского района (1934–1935, 1938 гг.); четырехкратно – в 6 селах (с. Духовское (1933–1936 гг.) Спасского, с. Борисовка (1919, 1937, 1938, 1941 гг.) и Богатырка (1937–1940 гг.) Уссурийского, г. Камень-Рыболов (1931–1934 гг.), п. Троицк (1934–1936, 1938 гг.) Ханкайского и с. Черниговка (1934–1936, 1938 гг.) Черниговского районов; трехкратно – в 6 пунктах, двукратно – в 12 и однократно – в 59 СНП. Отсутствуют данные о заболевших СХЖ в трех СНП Пожарского района, которые ранее находились на территории Хабаровского края.

Эпизоотические проявления сибирской язвы в Приморском крае с интервалом 1–3 года регистриро-

вались в 22 СНП (26,8 %), 4–9 лет – 4 (4,9 %), более чем 10-летний период – 2 пунктах (2,4 %). Наиболее продолжительные временные отрезки между повторными проявлениями сибирской язвы отмечены в с. Ляличи Михайловского района – через 20 лет (1931 и 1951 гг.) и с. Чернышевка Анучинского района – 27 лет (1949 и 1976 гг.).

Известно, что для специфической профилактики сибирской язвы животных на территории нашей страны в ветеринарной практике использовались несколько видов вакцин. Вакциной Ценковского начали прививать животных в 1887 г. Препарат СТИ для вакцинации животных используют с 1942 г., и, по нашим данным, эту вакцину в 1948 г. применяли в Сахалинской области. В 1953–1955 гг. внедрена в практику сибиризированная вакцина ГНКИ, в 1986 гг. – вакцина живая из штамма 55-ВНИИВИМ [12]. Для изучения закономерностей территориального распространения и проявлений эпизоотической активности СНП Приморского края нами выбрана методика М.Н. Локтионовой (2011) [13] с коррекцией временных интервалов по срокам начала массовой специфической иммунизации сельскохозяйственных животных на территории края по трем периодам: 1919–1941 гг. – вакциной Ценковского; 1942–1985 гг. – вакцинами СТИ, ГНКИ; 1986–2020 гг. – вакцинами штамма 55-ВНИИВИМ, комбинированной вакциной против ЭМКАРа и 55-ВНИИВИМ.

При анализе эпизоотической активности сибирской язвы в Приморском крае нами не были учтены сведения о сибирской язве во время строительства Уссурийской железной дороги (1894 г.) и Русско-японской войны (1904 г.), так как архивные материалы о местах эпизоотии, методах утилизации трупов животных и местах их захоронений отсутствуют. Всего за 102 года наблюдения отмечалось 153 проявления заболевания в виде спорадических случаев и вспышек болезни в 82 СНП.

Эпизоотическая активность сибирской язвы была высока в период иммунизации сельскохозяйственных животных вакциной Ценковского (1919–1941 гг.), в это время отмечались 119 вспышек и спорадических случаев сибирской язвы, с наиболее высокими показателями в 1932–1939 гг. Пик эпизоотической активности пришелся на 1934 г., когда заболевания 39 голов (16,8 %) животных регистрировались в 24 пунктах. Всего в период 1919–1941 гг. в 68 СНП 14 районов края заболели 110 животных, из них 67 КРС, 3 свиньи и 39 лошадей, вид одного животного не указан (табл. 2, рис. 3).

Во втором периоде (1942–1985 гг.) отмечались 34 (22 %) проявления болезни, при этом в 1948 г. наблюдался пик эпизоотической активности в пяти СНП (5 голов СХЖ), что в 3,5 раза ниже значения 1934 г. В этот период в 28 СНП 18 районов заболели 63 животных, из них 48 КРС, 5 свиней и 10 лошадей.

В третий период (1986–2020 гг.) случаи сибирской язвы не регистрировались. В течение послед-

Таблица 2 / Table 2

Заболевания сибирской язвой в Приморском крае по видам животных за 1919–2020 гг.

Anthrax cases in the Primorsky Territory by animal species over a period of 1919–2020

Периоды массовой иммунизации СХЖ, годы Periods of mass immunization of farm animals, years	KPC Cattle	Свиньи Pigs	Лошади Horses	Другие Others	Всего Total	Кол-во активных СНП Number of active SPHA	Кол-во активных районов Number of active districts
1919–1941	67	3	39	1	110	68	14
1942–1985	48	5	10	-	63	28	18
1986–2020	-	-	-	-	-	-	-
<i>Итого Total</i>	115	8	49	1	173	96	32

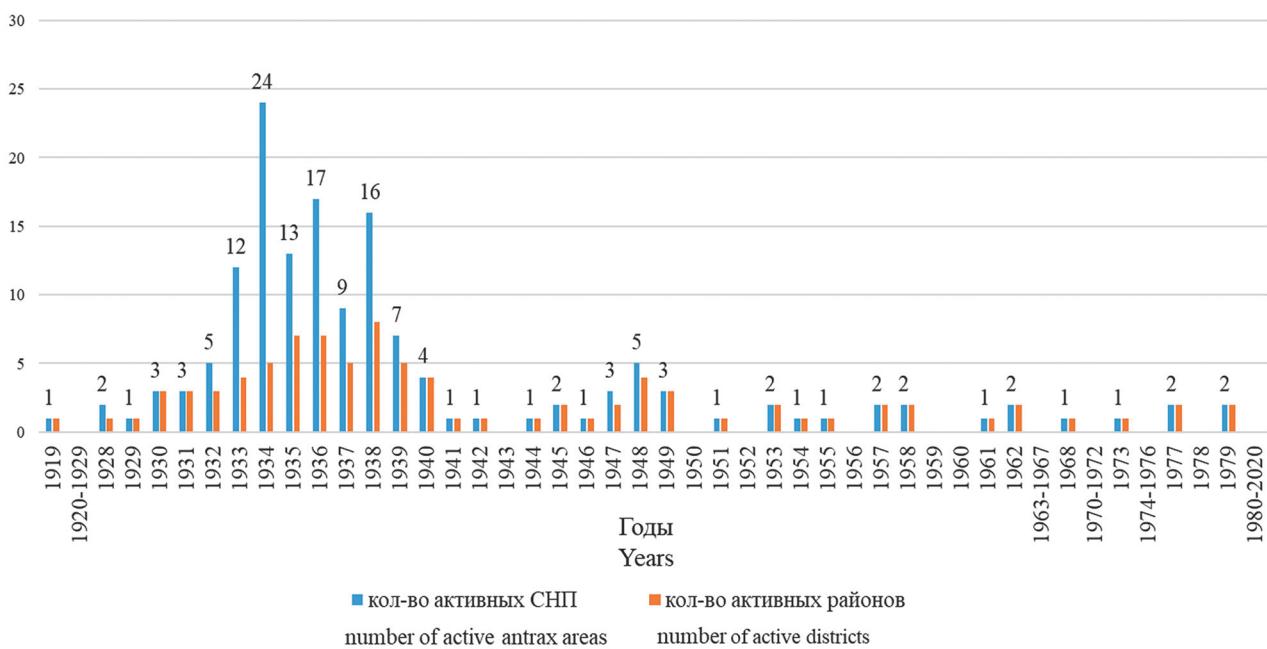


Рис. 3. Эпизоотическая активность СНП в Приморском крае за 1919–2020 гг. по трем периодам массовой иммунизации (1919–1941 гг., 1942–1985 гг. и 1986–2020 гг.)

Fig. 3. Epizootic activity of stationary potentially hazardous as regards anthrax areas in the Primorsky Territory in 1919–2020, by three periods of mass immunization (1919–1941, 1942–1985 and 1986–2020)

них 35 лет эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по сибирской язве на территории края остается относительно благополучной.

Значительная эпизоотическая активность наблюдалась в пяти районах края. В 13 СНП Спасского района в течение семи календарных лет (1933–1938, 1948 гг.) зарегистрированы 32 вспышки болезни у СХЖ. В Уссурийском районе за десять лет (1935–1941, 1944, 1949, 1973 гг.) произошла 21 вспышка в 10 СНП. В семи пунктах Черниговского района отмечалось 15 вспышек за период 1931–1953 гг. В Хорольском районе за четыре года (1933, 1934, 1936, 1940 гг.) отмечались 11 вспышек в девяти СНП. В Дальнереченском районе в 1935–1947 гг. сибирская язва встречалась также 11 раз в шести СНП, в том числе и г. Дальнереченске.

Экологический мониторинг сибирской язвы в СНП Приморского края

В 2013–2016 гг. проведен экологомикробиологический мониторинг по сибирской язве 42 СНП десяти муниципальных образований края, из них

в восьми с высоким и в двух – со средним риском заражения животных сибирской язвой. Отобраны и изучены 602 пробы почвы. Исследованные пробы почвы имели слабокислую и нейтральную реакцию (рН 5,3–6,75), на момент отбора проб температура воздуха составляла от +19 до +28 °С, колебания температуры почв на глубине 15–20 см – от +0,2 до +5,5 °С. Более половины исследованных проб почвы (54,4 %) не проявляли токсических свойств, треть проб (32,4 %) обладала средними и меньшая часть (13,2 %) – высокими токсичными свойствами по отношению к сибириязвенному микробу. Крайне низкие питательные свойства обнаружены у 76,5 % проб исследованных почв, низкие – 10,7 % проб, средние – 12,8 %. Исследования показали, что сохранению и выживанию возбудителя в почве края способствуют отсутствие токсичности (86,8 %) и наличие питательных свойств (23,5 %) почвы по отношению к сибириязвенному микробу.

Таким образом, первые случаи сибирской язвы в Приморском крае описаны в 1894 г. при строи-

тельстве Уссурийской железной дороги и в 1904 г. во время Русско-японской войны. Последние случаи заболеваний СХЖ и людей отмечены в 1979 г. в Кавалеровском и Октябрьском районах. В Кадастре СНП РФ (2005 г.) учет начат в 1919 г. – отмечены 72 неманифестных СНП края, при актуализации уточнены сведения по 82 пунктам. В шести районах края сибирская язва официально не регистрировалась. За период 1919–1979 гг. в крае зарегистрированы заболевания сибирской язвой 173 животных и 34 человек. Большая часть СНП сосредоточена на Приханкайской равнине, где велика концентрация транспортных магистралей, скота и населения. Высокая эпизоотическая активность сибирской язвы отмечалась в период 1919–1941 гг. В азиатской части РФ Приморский край относится к территориям средней степени эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия по сибирской язве. Мониторинг сибирской язвы показал, что сохранению возбудителя в почве десяти районов края могут способствовать отсутствие токсичности (86,8 %) и наличие питательных свойств (23,5 %) почвы по отношению к сибиризированному микробу.

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

Список литературы

- Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Литусов Н.В., Харечко А.Т., Васильев П.Г., Садовой Н.В., Кожухов В.В. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники и диагностики, лечения и профилактики. М.: ВУНМЦ МЗ РФ; 1999. 448 с.
- Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: ИНТЕРСЭН; 2002. 384 с.
- Красковский Е.Я., Уздин М.М., редакторы. История железнодорожного транспорта России. СПб.; 1994. Т. 1: 1836–1917. С. 145–80.
- Онищенко Г.Г., редактор. История становления и развития медико-санитарной службы на железнодорожном транспорте России. М.: Адвансед солюшнз; 2016. 480 с.
- Перечень пунктов пропуска через государственную границу Российской Федерации. Министерство транспорта Российской Федерации. [Электронный ресурс]. URL: https://mintrans.gov.ru/storage/app/media/lbs/graniza_pp_14012019.pdf (дата обращения 25.01.2021).
- Справочник населенных пунктов РСФСР, неблагополучных по сибирской язве. М.: Россельхозиздат; 1976. С. 76–8.
- Черкасский Б.Л., редактор. Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации: Справочник. М.: ИНТЕРСЭН; 2005. 829 с.
- Горковенко Л.Е., Туркуютов В.Б., Оленов А.В., Борзов В.П. Сибирская язва в Приморском крае (1904–1980 гг.). *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2003; 2(12):54–5.
- Дугаржапова З.Ф., Чеснокова М.В., Гольдапель Э.Г., Косилко С.А., Иннокентьева Т.И., Балахонов С.В. Сибирская язва в азиатской части Российской Федерации. Сообщение 1. Исторические сведения о распространении болезни в Сибири и на Дальнем Востоке. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 1:54–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-54-58.
- Розенберг Н.К. Инфекционные болезни с основами частной эпидемиологии. М.: Наркомздрав СССР; 1938. С. 631–644.
- Егорышева И.В., Шерстнева Е.В. Из истории борьбы с сибирской язвой в годы русско-японской войны (1904–1905). *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2002; 6:59–61.
- Иммунопрофилактика сибирской язвы. [Электронный

ресурс]. URL: <http://pactehok.ru/?cat=article&id=1998> (дата обращения 08.05.2020).

13. Локтионова М.Н., Симонова Е.Г. Закономерности территориального распределения и проявления активности стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации. *Инфекция и иммунитет*. 2012; 2(1-2):164–5.

References

- Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Litusov N.V., Kharechko A.T., Vasil'ev P.G., Sadovoy N.V., Kozhukhov V.V. [Anthrax: Relevant Aspects of Microbiology, Epidemiology, Presentation and Diagnostics, Treatment and Prevention]. Moscow; 1999. 448 p.
 - Cherkassky B.L. [Epidemiology and Prevention of Anthrax]. Moscow: INTERSEN; 2002. 384 p.
 - Kraskovsky E.Ya., Uzdin M.M., editors. [History of Railway Transport in Russia]. St. Petersburg; 1994. Vol. 1: 1836–1917. P. 145–80.
 - Onishchenko G.G., editor. [The History of the Formation and Development of the Medical and Sanitary Service in the Railway Transport of Russia]. Moscow: "Advanced Solutions"; 2016. 480 p.
 - [List of checkpoints across the state border of the Russian Federation. Ministry of Transport of the Russian Federation]. (Cited 25 Jan 2021). [Internet]. Available from: https://mintrans.gov.ru/storage/app/media/lbs/graniza_pp_14012019.pdf
 - Directory of settlements of the RSFSR, unfavorable for anthrax. Moscow: Rosselkhozizdat; 1976. P. 76–8.
 - Cherkassky B.L., editor. [Cadastr of Stationary Potentially Hazardous as Regards Anthrax Areas of the Russian Federation: Reference Book]. Moscow: INTERSEN; 2005. 829 p.
 - Gorkovenko L.E., Turkutukov V.B., Olenov A.B., Borzov V.P. [Anthrax in the Primorsky Territory (1904–1980)]. *Tikhookeansky Meditsinsky Zhurnal [Pacific Medical Journal]*. 2003; 2(12):54–5.
 - Dugarzhapova Z.F., Chesnokova M.V., Goldapel E.G., Kosilkov S.A., Balaikhonov S.V. [Anthrax in the Asian part of the Russian Federation. Communication 1. Historical remarks of the spread of the diseases in Siberia and Far East]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (1):54–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-54-58.
 - Rosenberg N.K. [Infectious Diseases with the Basics of Particular Epidemiology]. Moscow: Narkomzdrav of the USSR; 1938. P. 631–44.
 - Egorysheva I.V., Sherstneva E.V. [From the history of the fight against anthrax during the Russian-Japanese War (1904–1905)]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2002; 6:59–61.
 - [Immunoprophylaxis of anthrax]. (Cited 08 May 2020). [Internet]. Available from: <http://pactehok.ru/?cat=article&id=1998>.
 - Loktionova M.N., Simonova E.G. [Regularities of territorial distribution and manifestation of activity in the stationary potentially hazardous as regards anthrax areas in the Russian Federation]. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2012; 2(1-2):164–5.
- Authors:**
 Dugarzhapova Z.F., Ivacheva M.A., Chesnokova M.V., Kravets E.V., Balaikhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.
 Reshetnyak E.A., Detkovskaya T.N. Rospotrebnadzor Administration in the Primorsky Territory. 3, Selskaya St., Vladivostok, 690087, Russian Federation. E-mail: web@pkpnp.ru.
 Kuzin D.Yu., Umanets A.A. State Veterinary Inspectorate of the Primorsky Territory. 2, 1st Morskaya St., Vladivostok, 692007, Russian Federation. E-mail: uprvet@primorsky.ru.
- Об авторах:**
 Дугаржапова З.Ф., Ивачева М.А., Чеснокова М.В., Кравец Е.В., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.
 Решетняк Е.А., Детковская Т.Н. Управление Роспотребнадзора по Приморскому краю. Российская Федерация, 690087, Владивосток, ул. Сельская, 3. E-mail: web@pkpnp.ru.
 Кузин Д.Ю., Уманец А.А. Государственная ветеринарная инспекция Приморского края. Российская Федерация, 692007, Владивосток, ул. 1-я Морская, 2. E-mail: uprvet@primorsky.ru.

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

ОЦЕНКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНЦИАНВИОЛЕТА И МАЛАХИТОВОГО ЗЕЛЕНОГО В КАЧЕСТВЕ СЕЛЕКТИВНЫХ АГЕНТОВ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ БРУЦЕЛЛ

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

Цель работы – изучение ингибирующего действия генцианвиолета и малахитового зеленого в отношении двух тест-штаммов бруцелл и восьми штаммов микробов-ассоциантов, влияния автоклавирования на их активность; оценка вариабельности селективного действия разных партий красителей, необходимости корректировки концентрации красителей при изготовлении среды для выделения бруцелл. **Материалы и методы.** Использованы по три партии генцианвиолета и малахитового зеленого импортного производства. Ингибиторы вносили в среду культивирования, включающую панкреатические гидролизаты желатина и рыбной муки, дрожжевой экстракт, натрий хлористый, глюкозу, натрий сернистокислый пиро, agar микробиологический. Эту же среду без добавления красителей использовали в качестве контрольной. Действие красителей изучали с помощью тест-штаммов *Brucella abortus* 19 BA, *B. melitensis* Rev I, *Enterococcus faecium* VKM B-602, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* HX 19 222, *Pseudomonas aeruginosa* 22/99, *Serratia plymuthica* 1, *Shigella flexneri* 1a 8516, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterocolitica* C-187. **Результаты и обсуждение.** Определены показатели прорастания питательных сред, содержащих генцианвиолет в концентрации 5,0; 2,5; 1,25 mg/L, малахитовый зеленый в концентрации 2,0; 1,0; 0,5 mg/L при выращивании бруцелл. Установлено, что генцианвиолет в концентрации 5 mg/L может значительно ингибировать рост бруцелл. Рост *S. aureus* ATCC 25923 отсутствовал на всех средах, содержащих малахитовый зеленый, и средах с генцианвиолетом в концентрациях 5,0 и 2,5 mg/L. Малахитовый зеленый интенсивнее, чем генцианвиолет, ингибировал рост энтерококка, но слабее подавлял «росение» протея. Другие микробы-ассоцианты к действию использованных концентраций красителей были резистентны. Показана необходимость применения красителей в сочетании с другими селективными агентами, а также целесообразность введения генцианвиолета в стерильную среду, а малахитового зеленого – до ее автоклавирования. Концентрацию генцианвиолета при изготовлении питательной среды следует корректировать в связи с выявленными различиями ингибирующей активности в разных партиях данного красителя.

Ключевые слова: генцианвиолет, малахитовый зеленый, ингибция, селективные агенты, питательная среда, бруцеллы, микробы-ассоцианты.

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

Для цитирования: Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Катунина Л.С., Василенко Е.И. Оценка использования генцианвиолета и малахитового зеленого в качестве селективных агентов при выделении бруцелл. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 3:60–65. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-60-65.

Поступила 06.10.2020. Отправлена на доработку 29.10.2020. Принята к публ. 23.12.2020.

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

Assessment of the Use of Gentian Violet and Malachite Green as Selective Agents in the Isolation of Brucella

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. The aim of the work is to evaluate ability of gentian violet and malachite green to inhibit 2 *Brucella* test strains and 8 strains of unwanted organisms and the influence of autoclaving on their activity. The study also aims to evaluate variability of inhibition in different batches of colorants and necessity in adjustment of their concentration. **Materials and methods.** The study included 3 imported lots of gentian violet and malachite green. Inhibitors were put into nutrient medium containing pancreatic hydrolysates of gelatin and fish meal, yeast extract, sodium chloride, glucose, sodium pyrosulfate, and agar. The same medium without colorants was used as a control medium. Effect of the colorants was studied with the help of test strains of *Brucella abortus* 19 BA, *B. melitensis* Rev I, *Enterococcus faecium* VKM B-602, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* HX 19 222, *Pseudomonas aeruginosa* 22/99, *Serratia plymuthica* 1, *Shigella flexneri* 1a 8516, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterocolitica* C-187. **Results and discussion.** We have determined biological parameters of nutrient media containing gentian violet (5,0; 2,5 1,25 mg/L) and malachite green (2,0; 1,0; 0,5 mg/L) when cultivating brucella. Gentian violet is able to inhibit *Brucella* greatly at concentration of 5 mg/L. *S. aureus* ATCC 25923 did not show any growth on the media containing malachite green or gentian violet (5,0 and 2,5 mg/L). Malachite green inhibited the growth of *Enterococcus* more actively than gentian violet. However, it inhibited swarming growth of *Proteus* less successfully than gentian violet. Other unwanted organisms were not sensitive to such concentrations of colorants at all. We have demonstrated the necessity to combine colorants with other selective agents, as well as advisability to put gentian violet into sterile media, while malachite green – into the media before its autoclaving. Adjustments to the concentration of gentian violet should be made when producing nutrient medium, as variations in inhibiting activity in different batches of this colorant were revealed.

Key words: gentian violet, malachite green, inhibition, selective agents, nutrient medium, *Brucella*, unwanted organisms.

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

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

Citation: Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. Assessment of the use of gentian violet and malachite green as selective agents in the isolation of brucella. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:60–65. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-60-65. Received 06.10.2020. Revised 29.10.2020. Accepted 23.12.2020.

Kovtun Yu.S., ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4320-5877>
Kurilova A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7105-996111>

Katunina L.S., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8774-101x>
Vasilenko E.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7580-0991>

Использование красителей в качестве селективных агентов при выделении возбудителей опасных инфекционных болезней предусмотрено рядом нормативно-методических документов.

Так, методическими указаниями МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза» и рядом других документов предусмотрено добавление в питательную среду генцианвиолета в концентрации 5 мг/л, однако не приводится описание методики контроля ингибирующих свойств питательных сред. Методическими указаниями МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» регламентируется оценка ингибирующих свойств различных концентраций генцианвиолета, причем как в отношении чумного микроба, так и в отношении микробов-ассоциантов, из чего следует предположение о вариабельности селективного действия разных партий красителя. Способы применения коммерческих сред и сред лабораторного изготовления, содержащих генцианвиолет, не предусматривают его введение *ex tempore*, так как предпочтительнее добавление красителей в состав среды до автоклавирования из-за снижения риска контаминации и повышения точности дозирования [1, 2].

В ветеринарной практике в качестве селективного агента для выделения бруцелл, наряду с генцианвиолетом, нашел применение другой трифенилметановый краситель – малахитовый зеленый, в концентрации от 2 до 5 мг/л [3, 4]. L.M. Jones и W.J.B. Morgan при сравнении использования смеси красителей и смеси антибиотиков в качестве селективных агентов среды для выделения бруцелл отмечали, что красители ингибируют рост ряда штаммов бруцелл, требовательных к составу питательного субстрата и условиям культивирования [5]. Однако следует отметить, что в данном исследовании изучалась смесь генцианового фиолетового и малахитового зеленого в концентрациях 4 и 2 мг/л соответственно, которые могли быть чрезмерно высокими. Вместе с тем J. Keness *et al.* удалось выделить *Brucella melitensis* на среде Левенштейна – Йенсена, концентрация малахитового зеленого в которой составляла 250 мг/л [6–8].

Поскольку заболеваемость бруцеллезом стablyно сохраняется на высоком уровне, проблемы диагностики, выделения возбудителя не теряют своей актуальности, и в их совершенствовании существенное значение имеет уточнение ряда практических вопросов, связанных с использованием компонентов современных питательных сред, ин-

гибирующих постороннюю микрофлору, но не подавляющих рост бруцелл [9–11]. В связи с недостаточной освещенностью этого аспекта и отсутствием в доступных источниках сравнительных данных об использовании вышеупомянутых красителей в качестве селективных агентов при выделении бруцелл, были проведены настоящие исследования.

Цель работы – изучение ингибирующего действия генцианвиолета и малахитового зеленого в отношении тест-штаммов *Brucella abortus* 19 ВА, *B. melitensis* Rev I и 8 штаммов микробов-ассоциантов; оценка вариабельности селективного действия разных партий красителей и необходимости корректировки концентрации красителей при изготовлении среды для выделения бруцелл, а также изучение влияния автоклавирования на ингибирующую активность генцианвиолета и малахитового зеленого в составе этой среды.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись три партии генцианвиолета (A, B, C) и три партии малахитового зеленого (D, F, E) импортного производства. Ингибиторы вносили в среду культивирования следующего состава (г/л): панкреатические гидролизаты желатина и рыбной муки (из расчета содержания в 1 л среды сухих веществ) – 8,0 и 4,0 соответственно; дрожжевой экстракт – 2,0; натрий хлористый – 5,0; глюкоза – 1,0; натрий сернистокислый пиро – 0,1; агар микробиологический – 8,0–10,0. Показатель pH среды устанавливали в пределах (7,1±0,1) [12]. Этую же среду без добавления красителей использовали в качестве контрольной.

Селективное действие красителей изучали с помощью тест-штаммов *B. abortus* 19 ВА, *B. melitensis* Rev I, *Enterococcus faecium* VKM B-602, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* HX 19 222, *Pseudomonas aeruginosa* 22/99, *Serratia plymuthica* 1, *Shigella flexneri* 1a 8516, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterocolitica* C-187, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и Всероссийской коллекции микроорганизмов. Определение биологических показателей моделей питательных сред проводили в соответствии с методиками, изложенными в МУ 3.3.2.2124-06 и МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Расчетная посевная доза тест-штаммов бруцелл составляла 100 м.к., микробов-ассоциантов – 10000 м.к. на 1 чашку

Петри. Результаты посевов фиксировали в течение 30 дней.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ Biostat.

Результаты и обсуждение

Красители представляли собой мелкодисперсные кристаллические порошки темно-зеленого цвета с металлическим блеском. Генцианвиолет партии А и малахитовый зеленый партии Е содержали темно-зеленые блестящие кристаллообразные включения.

Данные о количестве колоний бруцелл, выросших в течение срока наблюдения на контрольной среде и средах, содержащих разные концентрации трех партий генцианвиолета, представлены в табл. 1. При изучении ингибирующего действия генцианвиолета наблюдалось существенное замедление роста, уменьшение числа и размера вырастающих колоний бруцелл на моделях сред, содержащих краситель партий А и В в концентрации 5 мг/л.

Видимый рост обнаруживался не ранее четвертых суток культивирования, в отдельных случаях появление колоний бруцелл наблюдалось только через 12 суток после посева. На шестые сутки количество колоний *B. abortus* 19 ВА, выросших на среде, включающей данную концентрацию указанных партий генцианвиолета, составляло от 9,8 до 23,5 %, а *B. melitensis* Rev I – от 1,6 до 7,5 % от числа колоний, выросших на третьи сутки инкубации на контрольной питательной среде. Размер колоний обоих штаммов колебался от точечного до среднего (1,5 мм).

К концу срока наблюдения (30 суток) число выросших колоний увеличивалось, однако кратно ($p<0,001$) уступало количеству колоний, выросших на контрольной среде; на части чашек рост отсутствовал и к этому времени. Была отмечена выраженная неоднородность колоний по размеру: в пределах одной чашки формировались колонии от точечных до колоний диаметром 6 мм. На контрольной среде через 72 ч культивирования вырастало ($92,31\pm3,36$) колоний *B. abortus* 19 ВА и ($95,76\pm4,27$) колоний

B. melitensis Rev I размером 1,5–2,5 мм. Включение в состав среды генцианвиолета партии С в концентрации 5 мг/л приводило к ингибированию роста бруцелл в значительно меньшей степени. Точечные колонии появлялись уже через 48 ч инкубации при температуре 37 °C, их диаметр на третьи сутки достигал около 1 мм, а количество составляло ($79,16\pm4,71$) колоний штамма *B. abortus* 19 ВА и ($47,32\pm5,86$) колоний штамма *B. melitensis* Rev I. В дальнейшем количество колоний увеличилось незначительно и статистически значимо уступало числу колоний, выросших на среде без ингибитора ($p<0,01$).

При посеве 100 микробных клеток на среду, содержащую 2,5 мг/л генцианвиолета партий А и В, колонии бруцелл обоих штаммов появлялись на третий – четвертый день, их диаметр на шестой день культивирования колебался от 2,0 до 3,0 мм, а количество варьировало от 58 до 83 % от количества колоний, выросших на контрольной среде, существенно уступало ему ($p<0,05$) и практически не изменилось до конца срока наблюдения. При концентрации 2,5 мг/л генцианвиолета партии С число колоний бруцелл незначительно уменьшалось ($p>0,05$), размер их составлял 0,2–0,4 мм через 48 ч и 2,5–3,5 мм через 144 ч (6 суток) культивирования при температуре (37 ± 1) °C.

Введение в среду генцианвиолета в концентрации 1,25 мг/л оказывало умеренное ингибирующее влияние на рост бруцелл. Различия в количестве колоний по сравнению с контрольной средой были недостоверными ($p>0,05$), отмечалось лишь незначительное уменьшение диаметра колоний на 0,1–0,5 мм в зависимости от продолжительности культивирования.

Из всех взятых в работу микробов-ассоциантов к генцианвиолету в концентрации 5 мг/л чувствительны *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecium* VKM B-602 и *P. vulgaris* HX 19 222. Рост стафилококков при указанном содержании красителя так же, как и при содержании 2,5 мг/л, полностью отсутствовал. Концентрация в среде культивирования 1,25 мг/л генцианвиолета партии А также полностью ингибировала размножение данных микроорганизмов, одна-

Таблица 1 / Table 1

Показатели прорастания питательных сред, содержащих различные концентрации генцианвиолета
Growth rate (number of CFU/plate) of *Brucella* strains on culture media with the different concentrations of gentian violet

Наименование тест-штаммов Test strains	Партия генцианвиолета Batch of gentian violet	Количество колоний, выросших при посеве из разведения 10^{-6} на среду, содержащую генцианвиолет, в концентрации: The number of colonies grown after sowing from dilution 10^{-6} on a medium containing gentian violet at the concentration:			
		5 мг/л 5 mg/l	2,5 мг/л 2,5 mg/l	1,25 мг/л 1,25 mg/l	контроль control
<i>B. abortus</i> 19 ВА	A	25,56±4,97	73,42±4,44	87,32±5,69	92,31±3,36
	B	28,50±6,11	76,68±3,13	91,92±4,51	
	C	82,18±4,63	93,22±5,13	90,73±4,88	
<i>B. melitensis</i> Rev I	A	7,04±3,61	57,60±5,08	92,38±5,46	95,76±4,27
	B	10,75±3,35	64,23±4,80	91,73±4,15	
	C	54,67±5,61	86,71±4,93	92,27±4,96	

ко колонии стафилококков были обнаружены на четвертые – пятые и седьмые – десятые сутки на средах, включающих краситель партий С и В по 1,25 мг/л.

Подавление роста *E. faecium* VKM B-602 в течение срока наблюдения (один месяц) обеспечивала только партия А генцианвиолета при содержании его 5 мг/л. Данная концентрация партии В задерживала видимый рост энтерококков в течение 72 ч. Меньшие концентрации партий А и В красителя, а также партия С во всех трех использованных концентрациях не оказывали заметного ингибирующего действия – рост энтерококков отмечался уже через 24 ч инкубации.

Полного подавления роста *P. vulgaris* HX 19 222 не обеспечила ни одна партия генцианвиолета ни в одной из изучаемых концентраций – через 24 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С рост наблюдался на всех чашках Петри. В это же время начиналось «роение» на чашках с моделями сред, содержащих 1,25 мг/л всех партий генцианвиолета и содержащих 2,5 мг/л генцианвиолета партии С. Через 48 ч инкубации «роение» наблюдалось на всех засеянных чашках, вместе с тем его интенсивность уменьшалась по мере повышения концентрации генцианвиолета партий А и В, для партии С такой связи не обнаружено – интенсивность «роения» не зависела от количества ингибитора, и даже при концентрации 5 мг/л рост распространялся на 90–95 % поверхности агаровой пластиинки. Следует также отметить резкое замедление скорости ползучего роста культуры, начиная с третьих суток инкубации.

Влияние разных концентраций малахитового зеленого на рост бруцелл изучали аналогично, посредством выращивания тест-штаммов *B. abortus* 19 ВА и *B. melitensis* Rev I на контрольной среде и девяти моделях сред, содержащих 0,5, 1 и 2 мг/л красителя трех различных партий, в течение срока наблюдения. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Добавление к среде малахитового зеленого в концентрации 2 мг/л приводило к задержке роста бруцелл, колонии становились видимыми только на четвертые-пятые сутки культивирования. На шестые сутки их размер варьировал от точечных до 0,6 мм,

среднее количество колоний составляло 67–86 % от количества колоний, выросших на контрольной среде, и было достоверно меньшим ($p<0,05$). Контрольная среда через 72 ч инкубации обеспечивала формирование ($90,91\pm4,08$) колоний *B. melitensis* Rev I и ($96,45\pm3,38$) колоний *B. abortus* 19 ВА диаметром 1,5–2,5 мм.

Уменьшение концентрации малахитового зеленого приводило к увеличению скорости роста, размера вырастающих колоний бруцелл и их количества. На среде, содержащей 1 мг/л красителя, колонии появлялись на трети – четвертые сутки, 0,5 мг/л – на вторые – трети сутки культивирования. На шестые сутки их диаметр в первом случае составлял 1,0–2,2 мм, во втором – 1,5–2,7 мм. Количество колоний бруцелл, выросших на данных средах, достоверно не отличалось от числа колоний, выросших на контрольной среде, не содержащей ингибиторов ($p>0,05$).

Все три партии малахитового зеленого подавляли рост золотистого стафилококка во всех изученных концентрациях, а также полностью ингибировали рост *E. faecium* VKM B-602 при содержании красителя 2 и 1 мг/л. Ингибция роста энтерококка при содержании в среде 0,5 мг/л малахитового зеленого была нестабильной: в ряде случаев на вторые-трети сутки культивирования появлялись колонии данного микроорганизма, которые, по сравнению с колониями бруцелл, были менее выпуклыми, часть имела приподнятый центр и/или зазубренный край.

Не выявлено существенного влияния малахитового зеленого на рост *P. vulgaris* HX 19 222. На вторые сутки после посева рост и «роение», распространяющееся более чем на 75 % поверхности среды в чашке Петри, наблюдалась при использовании всех изученных партий красителя и при всех примененных концентрациях. Отмечено, что на чашках Петри с тонким (менее 3 мм) слоем среды наблюдалось замедление ползучего роста протея.

Другие микробы-ассоцианты, за исключением *S. flexneri* 1a 8516, к действию примененных концентраций малахитового зеленого чувствительными не были. Рост шигелл отсутствовал при концентрации

Таблица 2 / Table 2

Показатели прорастания питательных сред, содержащих различные концентрации малахитового зеленого
Growth rate (number of CFU/plate) of Brucella strains on culture media with the different concentrations of malachite green

Наименование тест-штаммов Test strains	Партия малахитового зеленого Batch of malachite green	Количество колоний, выросших при посеве из разведения 10^{-6} на среду, содержащую малахитовый зеленый, в концентрации: The number of colonies grown after sowing from dilution 10^{-6} on a medium containing malachite green at the concentration:			
		2 мг/л 2 mg/l	1 мг/л 1 mg/l	0,5 мг/л 0,5 mg/l	контроль control
<i>B. abortus</i> 19 ВА	D	77,17±6,26	88,32±4,14	94,24±4,53	96,45±3,38
	E	80,26±6,84	88,02±3,40	93,20±3,36	
	F	83,04±4,97	84,67±5,43	85,97±6,94	
<i>B. melitensis</i> Rev I	D	61,77±5,63	84,60±4,68	96,08±5,62	90,91±4,08
	E	68,47±6,17	85,15±4,05	88,50±4,43	
	F	73,68±4,59	91,81±3,96	85,51±5,06	

малахитового зеленого 2 мг/л.

Для изучения влияния на специфическую активность питательных сред стерилизации автоклавированием применяли режим, используемый для большинства употребляемых в практике питательных сред лабораторного изготовления (температура 121 °С, время 20 мин). Содержание в испытуемых средах генцианвиолета составило 2,5 мг/л, малахитового зеленого – 1 мг/л. Указанная концентрация генцианвиолета выбрана вследствие того, что повышение ее вдвое чрезмерно подавляет рост бруцелл, а концентрация малахитового зеленого 2 мг/л не приводит к дополнительному эффекту, половинные же концентрации обоих красителей недостаточно ингибируют постороннюю микрофлору. Данные о количестве колоний бруцелл, выросших при посеве 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10⁻⁶, и стабильности их основных биологических свойств приведены в табл. 3.

При сравнении количества колоний бруцелл, выросших на испытуемых средах с красителями, добавленными до и после автоклавирования, выявлено, что добавление генцианвиолета в среду до стерилизации приводило к некоторому понижению, а малахитового зеленого – к повышению числа выросших колоний бруцелл относительно числа колоний, полученных при выращивании на средах, в которые красители были внесены после автоклавирования. Однако различия не являлись достоверными ($p>0,05$).

В случае использования генцианвиолета размер колоний был одинаковым, тогда как при добавлении малахитового зеленого в автоклавированную среду

диаметр вырастающих колоний на 25–30 % уступал диаметру колоний, полученных на питательной среде, в которую этот краситель был введен до стерилизации. Кроме того, при введении малахитового зеленого в среду до стерилизации колонии бруцелл появлялись на 12–24 ч раньше.

Не обнаружено влияние автоклавирования на ингибирующие свойства изученных красителей в отношении микробов-ассоциантов. На всех чашках отсутствовал рост золотистого стафилококка, колонии *E. faecium VKM B-602* вырастали на всех средах, включающих генцианвиолет, и отсутствовали на средах с малахитовым зеленым, схожими были рост и «роение» протея.

Полученные результаты свидетельствуют, что разные партии генцианвиолета характеризуются неодинаковой ингибирующей активностью, вследствие чего некорректно применение фиксированной концентрации красителя 5 мг/л. Перед изготовлением селективной питательной среды необходимо определять рабочую концентрацию каждой новой партии данного красителя с учетом ее ингибирующей активности как в отношении микробов-ассоциантов, так и в отношении бруцелл.

Ингибирующие свойства трех изученных партий малахитового зеленого различались в меньшей степени, однако для установления возможности исключения проверки ингибирующей активности конкретной партии красителя необходимо накопление большего числа наблюдений.

При изучении влияния автоклавирования на ингибирующие свойства генцианвиолета и малахитового зеленого выявлено, что специфическая актив-

Таблица 3 / Table 3

Влияние автоклавирования на специфическую активность питательных сред, содержащих генцианвиолет и малахитовый зеленый, в отношении тест-штаммов *B. abortus* 19 BA и *B. melitensis* Rev I

Impact of autoclaving on specific activity of nutrient media containing gentian violet and malachite green as regards *B. abortus* 19 BA and *B. melitensis* Rev I test strains

Тест-штаммы Test strains	Наименование показателей Indicators	Наименование красителя Name of the colorant			
		генцианвиолет gentian violet		малахитовый зеленый malachite green	
		добавлен до стерилизации added before sterilization	добавлен после стерилизации added after sterilization	добавлен до стерилизации added before sterilization	добавлен после стерилизации added after sterilization
<i>B. abortus</i> 19 BA	Прорастание, (M±m) % The number of colonies, (M±m) %	72,75±4,19	76,43±3,10	89,12±3,39	85,00±3,70
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний через 144 ч инкубации, морфология, % диссоциации) Stability of basic properties by colony morphology (colony diameter after 144 h of incubation, morphology, % dissociation)	2,0–2,5 мм, S-колонии, 0 2,0–2,5 mm, S-colonies, 0	2,0–2,5 мм, S-колонии, 0 2,0–2,5 mm, S-colonies, 0	1,7–2,3 мм, S-колонии, 0 1,7–2,3 mm, S-colonies, 0	1,3–1,7 мм, S-колонии, 0 1,3–1,7 mm, S-colonies, 0
<i>B. melitensis</i> Rev I	Прорастание, (M±m) % The number of colonies, (M±m) %	60,74±2,91	66,88±2,45	90,12±3,76	85,50±4,14
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний через 144 ч инкубации, морфология, % диссоциации) Stability of basic properties by colony morphology (colony diameter after 144 h of incubation, morphology, % dissociation)	2,0–2,5 мм, S-колонии, 0 2,0–2,5 mm, S-colonies, 0	2,0–2,5 мм, S-колонии, 0 2,0–2,5 mm, S-colonies, 0	1,9–2,5 мм, S-колонии, 0 1,9–2,5 mm, S-colonies, 0	1,3–1,7 мм, S-колонии, 0 1,3–1,7 mm, S-colonies, 0

ность питательных сред существенно не зависела от момента введения красителя – до или после стерилизации, но все же предпочтительнее внесение малахитового зеленого в среду до автоклавирования, а генцианвиолета – в стерильную.

Оба изученных красителя обладают достаточно ограниченным спектром ингибирующего действия на протестированные в рамках работы микробы-ассоцианты, и для удовлетворительного подавления сопутствующей микрофлоры, прежде всего грамотрицательной, при выделении бруцелл их целесообразно сочетать с селективными агентами, обладающими иной направленностью antimикробного действия. При использовании дополнительных ингибиторов грамотрицательной микрофлоры оптимальнее, по нашему мнению, их комбинация с малахитовым зеленым.

Несмотря на то, что генцианвиолет интенсивнее подавляет ползучий рост протея, малахитовый зеленый имеет ряд преимуществ: его ингибирующее действие на рост бруцелл значительно слабее, при этом есть возможность, не подавляя его, подобрать концентрацию, позволяющую полностью остановить размножение фекальных стрептококков, зачастую присутствующих в исследуемом материале. Кроме того, по сравнению с генцианвиолетом, малахитовый зеленый в гораздо меньшей степени влияет на изменение цветности среды.

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

Список литературы

- Шепелин А.П., Дятлов И.А. Питательные среды для энтеобактерий. М.: Династия; 2017. С. 76.
- Подплетенная И.М., Мищенко Д.Н. Модифицированная среда Кесслер для обнаружения бактерий группы кишечной палочки. Патент РФ № 2202618, опубл. 20.04.2003. Бюл. № 11.
- Васильев Д.А., Шербаков А.А., Карпунина Л.В., Золотухин С.Н. Методы частной бактериологии. Учебно-методическое пособие. Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия; 2004. 222 с.
- Питательные среды для культивирования бруцеллеза. [Электронный ресурс]. URL: <https://virus-infekciya.ru/bakterialnye/pitatelnye-sredy-dlya-kultivirovaniya-brucelleza.html> (дата обращения 17.11.2020).
- Jones L.M., Morgan W.J.B. A preliminary report on a selective medium for the culture of Brucella, including fastidious types. *Bull. World Health Organ.* 1958; 19(1):200–3.
- Keness J., Friedrich I., Banai M., Schonfeld S. *Brucella melitensis* growth on Loewenstein-Jensen egg medium from a case of *Brucella meningitis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 17(4):271–3. DOI: 10.1016/0732-8893(93)90035-6.
- Friedrich I., Schonfeld S., Keness Y. The ability of *Brucella melitensis* to grow on Loewenstein-Jensen egg medium: presentation of a case with *Brucella meningitis*. *Isr. J. Med. Sci.* 1992; 28(11):806–7.
- Hornsby R.L. Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. Iowa, Ames: Iowa State University; 1998. (Cited 22 Aug 2019) [Internet]. Available from: <https://lib.dr.iastate.edu/rtd/17852>.
- Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Khachaturova A.A., Skudareva O.N., Logvinenko O.V., Rakitina E.I., Kostyuchenko M.V., Semenko O.V., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. [Analysis of the epidemic and epizootic situation on brucellosis around the world in 2019 and the forecast for the Russian Federation for 2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):48–56. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-48-56.
- Karagul M.S., Ikiz S. The evaluation of *Brucella* spp. isolation rates in ruminant abortion cases by using different selective media. *Mac. Vet. Rev.* 2018; 41(2):177–86. DOI: 10.2478/macvetrev-2018-0024.
- Vicente A.F., Antunes J.M.A.P., Lara G.H.B., Mioni M.S.R., Allendorf S.D., Peres M.G., Appolinário C.M., Listoni F.J.P., Ribeiro M.G., Megid J. Evaluation of three formulations of culture media for isolation of *Brucella* spp. regarding their ability to inhibit the growth of contaminating organisms. *BioMed. Res. Int.* 2014; 2014:702072. DOI: 10.1155/2014/702072.
- Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Катунина Л.С., Василенко Е.И. Сравнительная оценка белковых гидролизатов при разработке на их основе питательной среды для культивирования бруцелл. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (4):93–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-93-97.

References

- Shepelin A.P., Dyatlov I.A. [Nutrient Media for Enterobacteria]. Moscow: Publishing house "Dynasty"; 2017. 76 p.
- Podpletenaya I.M., Mishchenko D.N. [Modified Kessler medium for the detection of *E. coli* bacteria]. RF patent No. 2202618, publ. 20.04.2003. Bul. No. 11.
- Vasil'ev D.A., Shcherbakov A.A., Karpunina L.V., Zolotukhin S.N. [Special Bacteriology Methods. Study Guide]. Ulyanovsk: Ulyanovsk State Agricultural Academy; 2004. 222 p.
- [Nutrient media for the cultivation of brucellosis]. (Cited 17 Nov 2020). [Internet]. Available from: <https://virus-infekciya.ru/bakterialnye/pitatelnye-sredy-dlya-kultivirovaniya-brucelleza.html>.
- Jones L.M., Morgan W.J.B. A preliminary report on a selective medium for the culture of *Brucella*, including fastidious types. *Bull. World Health Organ.* 1958; 19(1):200–3.
- Keness J., Friedrich I., Banai M., Schonfeld S. *Brucella melitensis* growth on Loewenstein-Jensen egg medium from a case of *Brucella meningitis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 17(4):271–3. DOI: 10.1016/0732-8893(93)90035-6.
- Friedrich I., Schonfeld S., Keness Y. The ability of *Brucella melitensis* to grow on Loewenstein-Jensen egg medium: presentation of a case with *Brucella meningitis*. *Isr. J. Med. Sci.* 1992; 28(11):806–7.
- Hornsby R.L. Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. Iowa, Ames: Iowa State University; 1998. (Cited 22 Aug 2019) [Internet]. Available from: <https://lib.dr.iastate.edu/rtd/17852>.
- Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Khachaturova A.A., Skudareva O.N., Logvinenko O.V., Rakitina E.I., Kostyuchenko M.V., Semenko O.V., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. [Analysis of the epidemic and epizootic situation on brucellosis around the world in 2019 and the forecast for the Russian Federation for 2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):48–56. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-48-56.
- Karagul M.S., Ikiz S. The evaluation of *Brucella* spp. isolation rates in ruminant abortion cases by using different selective media. *Mac. Vet. Rev.* 2018; 41(2):177–86. DOI: 10.2478/macvetrev-2018-0024.
- Vicente A.F., Antunes J.M.A.P., Lara G.H.B., Mioni M.S.R., Allendorf S.D., Peres M.G., Appolinário C.M., Listoni F.J.P., Ribeiro M.G., Megid J. Evaluation of three formulations of culture media for isolation of *Brucella* spp. regarding their ability to inhibit the growth of contaminating organisms. *BioMed. Res. Int.* 2014; 2014:702072. DOI: 10.1155/2014/702072.
- Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. [Comparative evaluation of protein hydrolysates in the process of constructing based on them nutrient medium for brucella cultivating]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (4):93–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-93-97.

Authors:

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

Об авторах:

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

Е.В. Коломоец¹, Я.Ю. Ицков¹, Е.В. Найденова², В. Кономоу³, С. Кеита⁴, Р. Ламах⁴

СОЗДАНИЕ И ОБЕСПЕЧЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГОСПИТАЛЬНОЙ СЕТИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ COVID-19 В ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

¹ОК «РУСАЛ», Москва, Российская Федерация; ²ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ³Научный клинический центр эпидемиологии и микробиологии, г. Киндия, Гвинейская Республика; ⁴Министерство здравоохранения Гвинеи, г. Конакри, Гвинейская Республика

В работе приводятся сведения о строительстве, развитии и порядке функционирования госпитальной сети для выявления и лечения больных опасными инфекционными болезнями в Гвинейской Республике. При поддержке ОК «РУСАЛ» и при содействии Министерства здравоохранения Гвинеи созданы стационары для оказания медицинской помощи пациентам с подозрением на COVID-19. Больные поступают из региональных госпиталей со всей территории Гвинеи. Основную часть госпитализированных лиц составляют больные с легкими и среднетяжелыми формами заболевания. Диагностические исследования методом ОТ-ПЦР для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 осуществляются на базе стационарной (г. Киндия) и мобильной (г. Фрия) лабораторий. Тестирование поступивших проб проводится с использованием диагностических препаратов отечественного и зарубежного производства. Данный этап работы выполняют сотрудники учреждений Роспотребнадзора (Российская Федерация), работающие на территории Гвинейской Республики. Всего с начала эпидемии лечение на базе госпиталей получили более 630 пациентов, с целью выявления РНК вируса SARS-CoV-2 проведено более 20 тыс. исследований проб клинического материала. Помимо жителей Гвинеи медицинская помощь оказана гражданам России, Украины, Беларуси, Казахстана, Китая, Индии, Сьерра-Леоне, Коморских островов. Организация сети госпиталей и включение их в национальную систему противодействия распространению новой коронавирусной инфекции позволили начать активную работу по выявлению и лечению больных COVID-19 на территории Гвинейской Республики и внести существенный вклад в борьбу с эпидемией.

Ключевые слова: новая коронавирусная инфекция, госпитальная сеть, вирус SARS-CoV-2, Гвинейская Республика, методы лечения COVID-19.

Корреспондирующий автор: Найденова Екатерина Владимировна, e-mail: katim2003@mail.ru.

Для цитирования: Коломоец Е.В., Ицков Я.Ю., Найденова Е.В., Кономоу В., Кеита С., Ламах Р. Создание и обеспечение функционирования госпитальной сети для лечения больных COVID-19 в Гвинейской Республике. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 3:66–71. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-66-71.

Поступила 06.09.2021. Отправлена на доработку 12.09.2021. Принята к публ. 17.09.2021.

E.V. Kolomoets¹, Ya.Yu. Itskov¹, E.V. Naidenova², V. Konomou³, S. Keita⁴, R. Lamah⁴

CREATION AND SUPPORT OF OPERATION OF A HOSPITAL NET TO TREAT COVID-19 PATIENTS IN GUINEA

¹UC “RUSAL”, Moscow, Russian Federation;

²Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

³Scientific Clinical-Diagnostic Center of Epidemiology and Microbiology, Kindia, Republic of Guinea;

⁴Ministry of Health of the Republic of Guinea, Conakry, Republic of Guinea.

Abstract. The paper provides information on the construction, development and functioning of a hospital network for the detection and treatment of patients with dangerous infectious diseases in the Republic of Guinea. With the support of UC RUSAL and with the assistance of the Ministry of Health of Guinea, hospitals have been established to provide medical care to patients suspected of COVID-19. Sick persons are admitted from regional hospitals from all over country. The majority of the hospitalized persons are patients with mild and moderate forms of the disease. Diagnostic studies using RT-PCR to detect SARS-CoV-2 virus RNA are carried out at the premises of stationary (Kindia) and mobile (Fria) laboratories. Testing of the received samples is carried out using diagnostic preparations of domestic and foreign production. This stage of work is performed by employees of the Rospotrebnadzor institutions (the Russian Federation) working on the territory of the Republic of Guinea. In total, since the beginning of the epidemic, more than 630 patients have received treatment in the stated hospitals; more than 20 thousand tests of clinical material samples have been conducted to detect the RNA of the SARS-CoV-2 virus. In addition to residents of Guinea, medical assistance was provided to citizens of Russia, Ukraine, Belarus, Kazakhstan, China, India, Sierra Leone, and the Comoros. The organization of the network of hospitals and their inclusion into the national system for counteracting the spread of new coronavirus infection allowed us to begin active work on the identification and treatment of COVID-19 patients in the territory of the Republic of Guinea and make a significant contribution to the fight against the epidemic.

Key words: new coronavirus infection, hospital network, SARS-CoV-2 virus, Republic of Guinea, methods of treatment of COVID-19.

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

Corresponding author: Ekaterina V. Naidenova, e-mail: katim2003@mail.ru.

Citation: Kolomoets E.V., Itskov Ya.Yu., Naidenova E.V., Konomou V., Keita S., Lamah R. Creation and Support of Operation of a Hospital Net to Treat COVID-19 Patients in Guinea. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:66–71. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-66-71.

Received 06.09.2021. Revised 12.09.2021. Accepted 17.09.2021.

Naidenova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>

В 2015 г., в разгар эпидемии болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ), компанией «РУСАЛ» при участии сотрудников Роспотребнадзора в районе г. Киндия (Гвинейская Республика) построен первый в стране стационарный госпиталь для лечения больных этой тяжелой инфекционной болезнью, который в дальнейшем преобразован в Научный клинический центр эпидемиологии и микробиологии (НКДЦЭМ) – Clinical Diagnostic Research Center of Epidemiology and Microbiology (CREMS). Эпидемия БВВЭ получила широкое распространение на территории трех государств Западной Африки: Гвинеи, Либерии и Сьерра-Леоне. Зарегистрированы завозные случаи инфекции в сопредельных государствах (Нигерии, Сенегале, Мали), а также в других странах и на континентах: США, Испании, Италии и Великобритании. С 2014 по 2016 год инфицированы вирусом Эбола 28652 человека, 11325 из которых погибли (39,5 %) [1].

В Гвинейской Республике в общей сложности зарегистрировано 3814 случаев БВВЭ и 2542 летальных исхода (66,6 %) [2]. Во время эпидемии в Гвинее достаточно долгое время не хватало учреждений, предназначенных для лечения больных этой опасной инфекционной болезнью. Специализированные лечебные центры функционировали только в городах Конакри и Гекеду. Необходимость создания еще одного медицинского пункта, на базе которого можно проводить выявление и лечение больных БВВЭ, была очевидна [3]. ОК «РУСАЛ» профинансированы разработка проекта и дальнейшее строительство специализированного госпиталя с максимальным уровнем защиты, позволяющего оказывать лечебную помощь больным с подозрением на особо опасные инфекционные болезни бактериальной и вирусной этиологии. Общий объем инвестиций составил более 10 млн долл. Специалисты Роспотребнадзора Российской Федерации методически сопровождали все этапы проектирования, строительства и ввода госпиталя в эксплуатацию, осуществляли контроль соблюдения требований биологической безопасности и противоэпидемического режима во время работы [4]. При создании проекта и во время строительных работ использованы новейшие российские инженерные и медицинские разработки, учтены основные условия и принципы проектирования и эксплуатации инфекционных госпиталей, а также требования отечественных и международных нормативных документов.

Открытие госпиталя состоялось 15 января 2015 г. Всего за 2015–2016 гг. в НКДЦЭМ поступили 104 пациента с подозрением на БВВЭ, у 32 из них диагноз подтвержден, 12 человек погибли [5]. Помимо лечебной и диагностической деятельности

осуществлялась и научная работа. Так, в результате проведенных исследований доказана персистенция жизнеспособного вируса Эбола в грудном молоке пациентки с подтвержденным диагнозом БВВЭ, проходившей лечение в госпитале, через две недели после полного выздоровления, отсутствия клинических симптомов и двукратного отрицательного результата тестирования сыворотки крови методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) (с интервалом 48 ч) [6]. Полученные данные доказали, что необходимо использовать в качестве проб клинического материала не только кровь и сыворотку крови, но и другие биологические жидкости пациентов, а также позволили пересмотреть критерии выписки больных БВВЭ.

В 2017 г. на территории госпиталя при поддержке Правительства Российской Федерации (распоряжение Правительства РФ от 25.07.2015 № 1448-р) создан и начал функционировать Российско-Гвинейский научно-исследовательский центр эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней, построена лаборатория. Лабораторный комплекс располагает инженерными системами и аналитическим оборудованием на основе передовых диагностических технологий, что обеспечивает проведение исследований на современном уровне, в максимально сжатые сроки и с соблюдением требований биологической безопасности. На базе Центра проводятся совместные экспериментальные и диагностические исследования, широкомасштабные экспедиционные работы, направленные на укрепление системы эпидемиологического надзора за опасными инфекционными заболеваниями в Гвинейской Республике [7].

Во время эпидемии кори, охватившей страны Африки, в том числе и Гвинейскую Республику, в 2017–2018 гг. в госпитале НКДЦЭМ проводились диагностические исследования с целью выявления возбудителя данной инфекционной болезни в клиническом материале от больных с последующим их лечением [8].

В 2020 г., с момента начала эпидемии новой коронавирусной инфекции в Гвинейской Республике, стала очевидна необходимость создания дополнительных стационаров для приема и лечения больных COVID-19. При поддержке ОК «РУСАЛ» и при содействии Министерства здравоохранения страны госпиталь НКДЦЭМ перепрофилирован для оказания помощи больным с подозрением на данное инфекционное заболевание и включен в национальную систему противодействия его распространению. Первый пациент поступил в госпиталь для лечения 16 апреля 2020 г. [9].

Структура лечебного учреждения представляет собой сложную автономную систему лечебно-

диагностических, хозяйственно-технических, охранных и жилых корпусов (рис. 1).

Все помещения госпиталя обнесены двойным ограждением и находятся под круглосуточной охраной. Выделены отдельные входы для персонала и доставки больных и проб на исследование. На самой территории госпиталя разграничены чистая и грязная зоны, что обеспечивает надежную изоляцию больных, возможность проведения диагностических и лечебных мероприятий, исключение перекрестного инфицирования, надлежащие санитарно-гигиенический и противоэпидемический режимы.

Коекочный фонд госпиталя НКДЦЭМ составляет 60 койко-мест, распределенных между двумя зонами: 16 коек – провизорная, 44 койки – инфекционная.

Все палаты двухместные, в каждую имеется отдельный вход, соединенный общим коридором. В случае большого поступления больных существует возможность увеличить вместимость корпусов в несколько раз. В структуре НКДЦЭМ предусмотрены палаты интенсивной терапии (ПИТ), помещение для проведения плазмафереза и морг с холодильной камерой. ПИТ снабжены медицинской аппаратурой, позволяющей оказывать реанимационную помощь и вести непрерывный мониторинг жизненно важных показателей пациентов: температуры тела, артериального давления, насыщения крови кислородом, сердечного ритма, частоты сердечных сокращений. Отделение для плазмафереза оснащено автоматизированным аппаратом Hemonetics PCS-2 (Немот-

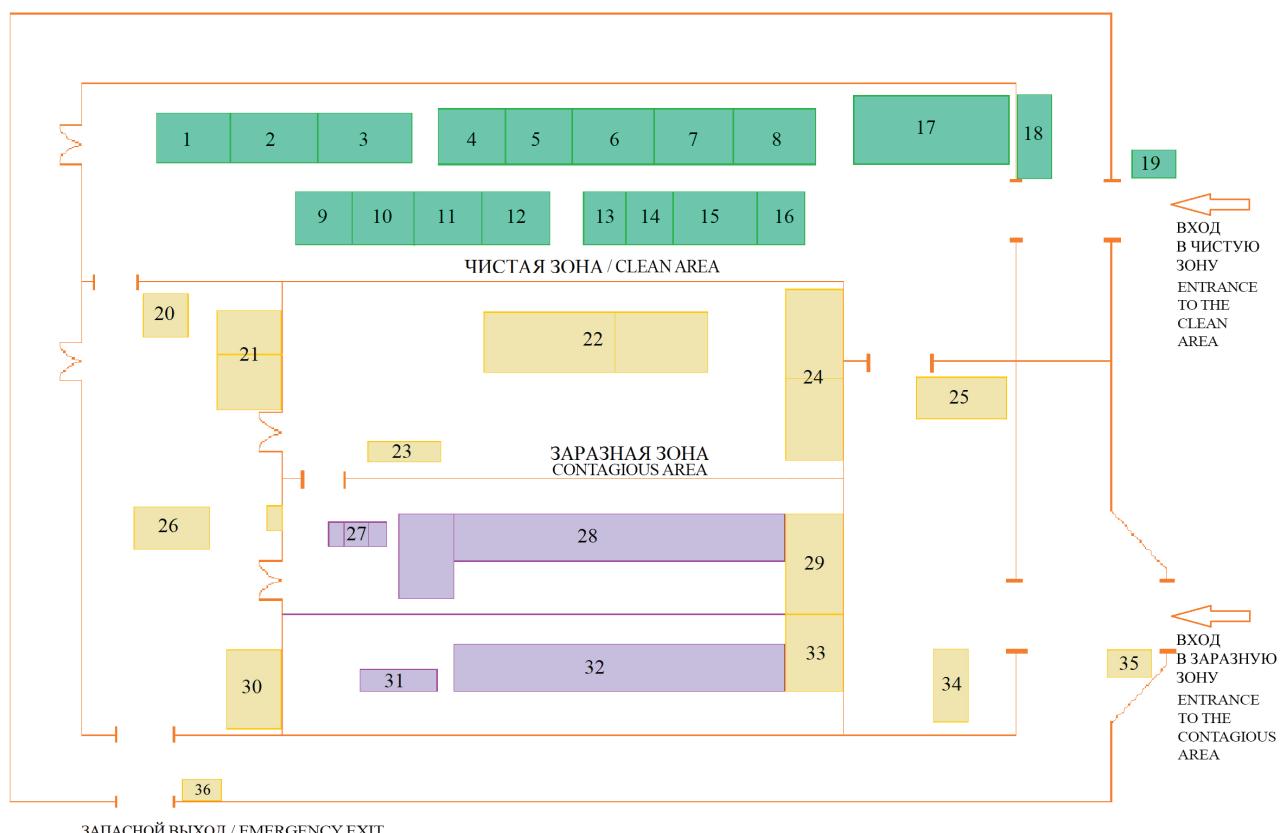


Рис. 1. Общий план-схема организации госпиталя НКДЦЭМ:

1 – помещение для работы с документами; 2–8 – комнаты для проживания персонала; 9 – лаборатория для проведения клинических исследований; 10 – помещение для плазмафереза; 11–12 – аптечный и медицинский склады; 13–15 – административные помещения, конференц-зал; 16 – кухня; 17 – стоянка для автомобилей; 18 – генераторная группа; 19 – пост круглосуточной охраны; 20 – лабораторный склад; 21 – санитарный пропускник для выписки пациентов; 22 – палаты для пациентов с неподтвержденным диагнозом; 23 – хозяйственные помещения; 24 – раздельный санпропускник для пациентов и для персонала; 25 – площадка для санитарной обработки автотранспорта; 26 – печь для утилизации отходов; 27 – септик с трехуровневой системой обеззараживания; 28 – лабораторный корпус; 29 – санитарный пропускник для сотрудников лаборатории; 30 – санитарный пропускник для выписки больных с подтвержденным диагнозом; 31 – хозяйственные помещения; 32 – палата для больных с подтвержденным диагнозом и ПИТ; 33 – санитарный пропускник для медицинского персонала; 34 – помещения для обработки СИЗ; 35 – пост круглосуточной охраны; 36 – пост круглосуточной охраны

Fig. 1. General outline of the hospital at the premises of CREMS:

1 – room for working with documents; 2–8 – rooms for staff accommodation; 9 – laboratory for clinical trials; 10 – room for plasmapheresis; 11–12 – pharmacy and medical warehouses; 13–15 – administrative premises, conference hall; 16 – kitchen; 17 – parking for cars; 18 – generator lot; 19 – round-the-clock security post; 20 – laboratory warehouse; 21 – a sanitary inspection room for the discharge of patients; 22 – wards for patients with unconfirmed diagnosis; 23 – utility rooms; 24 – separate sanitary inspection room for patients and staff; 25 – area for sanitizing vehicles; 26 – furnace for waste disposal; 27 – septic tank with a three-level disinfection system; 28 – laboratory building; 29 – sanitary checkpoint for laboratory staff; 30 – a sanitary checkpoint for the discharge of patients with a confirmed diagnosis; 31 – utility rooms; 32 – ward for patients with a confirmed diagnosis and ICU; 33 – sanitary inspection room for medical personnel; 34 – premises for processing PPE; 35 – round-the-clock security post; 36 – round-the-clock security post

netics Corporation, США) и всеми необходимыми расходными материалами для проведения процедуры. С начала эпидемии в НКДЦЭМ заготовлено и передано на хранение 11 доз плазмы крови людей, переболевших COVID-19, которые могут использоваться для лечения пациентов с тяжелым течением заболевания. На территории госпиталя функционирует собственная клинико-диагностическая лаборатория, где проводятся следующие виды исследований: общий анализ крови, определение уровня глюкозы в крови, общий анализ мочи, быстрые тесты и микроскопия мазков для обнаружения малярийного плазмодия, исследования методом ИХА для выявления возбудителей СПИДа, сифилиса, тифоидных заболеваний.

В чистой зоне расположены скважина для воды, электрические генераторы для бесперебойного обеспечения центра электроэнергией, помещения для персонала, прачечная, склад изделий медицинского назначения и медикаментов, офисы главного врача и координатора, отдельный блок для приготовления пищи. Утилизация твердых, биологически опасных отходов осуществляется в специально спроектированных газовых печах-utiлизаторах высокого давления.

Для размещения пациентов из удаленных районов северной части Гвинеи 11 июля 2020 г. на базе госпиталя боксито-глиноземного комплекса «Фригия» («Friguia») в г. Фрия открыто еще одно медицинское отделение для лечения больных COVID-19. Новый стационар построен и введен в эксплуатацию в максимально короткие сроки (21 день), рассчитан на 38 коек и имеет в своем составе реанимационную палату с двумя аппаратами искусственной вентиляции легких, мониторами и концентраторами кислорода.

Потоки движения пациентов организованы согласно требованиям отечественных и международных нормативных документов и рекомендаций.

Больные с подозрением на COVID-19 поступают из региональных госпиталей городов Конакри, Боке, Боффа, Коя, Фрия, Маму, Киндия, Лабе, Нзерекоре, Канкан, Дабола, Далаба и других регионов Гвинейской Республики на специализированном автотранспорте в сопровождении медиков (рис. 2).

В работе госпитальной сети задействован гвинейский медицинский персонал, имеющий большой опыт лечения больных с инфекционной патологией в период эпидемий. Всего в госпитале НКДЦЭМ работают 4 врача, 2 лаборанта, 2 реанимационные медсестры, 11 гигиенистов, имеющих среднее медицинское образование, а также обслуживающий персонал (администратор, водители, охрана, работники прачечной и кухни). В отделении по лечению больных COVID-19 госпиталя «Фригия» медицинскую работу проводят 4 врача-терапевта, 8 медсестер, 4 гигиениста и 6 человек обслуживающего персонала. Прием больных ведется в круглосуточном режиме, для всех работников учреждений госпитальной сети определен график дежурств. Кроме того, на базе НКДЦЭМ регулярно проводятся обучение и стажировка для сотрудников других лечебных учреждений Гвинеи.

Диагностические работы по выявлению возбудителя новой коронавирусной инфекции осуществляются на базе стационарной (г. Киндия) и мобильной (г. Фрия) лабораторий, находящихся на территории госпиталей. Забор проб от пациентов осуществляют гвинейские специалисты. Клинический материал поступает не только от лиц, находящихся на лече-

Рис. 2. Учреждения госпитальной сети и регионы, откуда поступают пациенты и пробы на исследования

Fig. 2. Institutions of the hospital network and regions from where patients and samples for research come from



нии в госпиталях НКДЦЭМ и «Фригия», но и из медицинских учреждений других городов и регионов Гвинеи. Диагностические исследования проводятся методами ОТ-ПЦР и иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов отечественного и зарубежного производства. Данный этап работы выполняют сотрудники учреждений Роспотребнадзора (Российская Федерация), работающие на территории Гвинейской Республики вахтовым методом. Сведения о полученных результатах анализов ежедневно заносятся в общую лабораторную сеть, куда поступает информация из всех учреждений Гвинеи, осуществляющих диагностику COVID-19. Помимо этого в лаборатории проводятся тесты на широкий спектр других опасных природно-очаговых и социально значимых инфекционных болезней (более 25 нозологий). Общая мощность обеих лабораторий составляет 300 исследований в сутки.

Необходимо отметить, что первые данные о выявлении РНК нового коронавируса SARS-CoV-2 в Гвинейской Республике получены российскими специалистами 3 февраля 2020 г. на базе лаборатории Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней (г. Киндиа). Оперативность и качество выполнения анализа высоко оценены органами здравоохранения Гвинеи и представителями международных медицинских организаций [10].

Основную часть госпитализированных лиц составляют больные с легкими и среднетяжелыми формами заболевания. Методы ведения пациентов, используемые в данных учреждениях, основаны на протоколе по лечению больных COVID-19, утвержденном Министерством здравоохранения Гвинейской Республики в апреле 2020 г. При любом течении болезни придерживаются следующей схемы: 600 мг гидроксихлорохина сульфата в 3 приема (10 мг/кг/сутки у детей старше 6 лет) и азитромицина в 1-й день по 500 мг/сут, в последующие 2–4 дня – по 250 мг. В качестве вспомогательных препаратов, применение которых диктуется клиническими проявлениями, используют парацетамол по 500 мг 3 раза в сутки на протяжении 7 дней, витамин С – 1000 мг 1 раз/сут – 10 дней, препараты цинка – 20 г/кг/сут – 10 дней. При тяжелом течении болезни в схему лечения вводят эноксапарин натрия 100 UI/кг через 12 часов, дексаметазон – 20 мг/сут первые 5 дней, а затем по 10 мг/сут еще 5 дней, в последующем дозу снижают до 4 мг/сут еще на 4 дня, добавляют цефтриаксон, который принимают 2–4 г/сут последующие 7 дней, оксигенотерапию, при необходимости – искусственную вентиляцию легких.

С начала эпидемии на базе стационаров госпиталей НКДЦЭМ и «Фригия» лечение получили 648 пациентов, из которых 637 выздоровели, 7 переведены в другие медицинские учреждения, 4 пациента с тяжелыми сопутствующими заболеваниями (диабет, туберкулез) погибли. Коэффициент смертности

составил 0,6 %, что ниже общемировых показателей. Кроме того, под наблюдением медицинского персонала госпиталя амбулаторно пролечено 98 пациентов с легкой и средней формами течения болезни. Помимо жителей Гвинейской Республики медицинская помощь оказана гражданам России, Украины, Беларуси, Казахстана, Китая, Индии, Сьерра-Леоне, Коморских островов.

Одним из показателей эффективности работы госпитальной сети является отсутствие случаев внутрибольничного инфицирования персонала, что обусловлено строгим соблюдением правил биологической безопасности. С момента начала работы обоих госпиталей заболели 11 медицинских работников и 9 сотрудников подрядных организаций. При выявлении возможных источников инфицирования установлено, что все заболевшие контактировали с больными COVID-19 в семейных очагах по месту жительства.

В феврале–марте 2021 г. на территории Гвинейской Республики вновь зафиксированы случаи БВВЭ [11]. В кратчайшие сроки в госпитале НКДЦЭМ проведена модернизация оборудования и помещений, что при необходимости позволит принимать больных этой опасной инфекционной болезнью и проводить лечение.

Таким образом, всего с момента начала эпидемии новой коронавирусной инфекции на базе госпиталей НКДЦЭМ и «Фригия» лечение получили 648 пациентов (по данным на 15 августа 2021 г.). С целью выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР проведено более 20 тыс. исследований, в 2602 случаях получен положительный результат.

Создание при поддержке ОК «РУСАЛ» госпитальной сети позволило начать активную работу по выявлению и лечению больных новой коронавирусной инфекцией и внести существенный вклад в борьбу с эпидемией COVID-19 в Гвинейской Республике. Лаборатория Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней стала первой в стране, где проводятся диагностические исследования с использованием молекуллярно-генетических и иммуносерологических методов. В настоящее время работа продолжается.

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

Благодарность. Авторский коллектив выражает благодарность всем сотрудникам Роспотребнадзора, принимавшим участие в проведении диагностических исследований, а также персоналу госпиталей НКДЦЭМ и «Фригия».

Acknowledgements. *The team of authors would like to express gratitude to all the Rospotrebnadzor employees who took part in the diagnostic testing, as well as to the personnel of the CREMS and "Frigua" hospitals.*

Список литературы

1. Interim infection prevention and control guidance for care of patients with suspected or confirmed Filovirus Hemorrhagic Fever in healthcare settings, with focus on Ebola. WHO/HIS/SDS/2014.4 Rev. 1. World Health Organization. [Электронный ресурс]. URL: http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/filovirus_infection_control/en (дата обращения 15.06.2021).
2. Health worker Ebola infections in Guinea, Liberia and Sierra Leone. Preliminary report WHO. 2015. [Электронный ресурс]. URL: http://www.who.int/hrh/documents/21may2015_web_final.pdf (дата обращения 15.06.2021).
3. Малеев В.В., Толно Ф., Кономов К.В., Соловьев Т.И., Ицков Я.Ю., Демина Ю.В., Левковский А.Е., Коломоец Е.В., Ковалев Г.А., Хорошилов В.Ю., Омарiev З.М. Эпидемиологические и клинические особенности болезни, вызванной вирусом Эбола, в Гвинейской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 3:27–32. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-3-27-32.
4. Безсмертный В.Е., Бредихин В.Н., Конева А.С., Панин Ю.А., Поздняков И.В., Ицков Я.Ю., Коломоец Е.В., Левковский А.Е. Опыт создания стационарного инфекционного госпиталя для лечения особо опасных инфекционных болезней в Гвинейской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 3:13–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-3-13-5.
5. Найденова Е.В., Лопатин А.А., Сафонов В.А., Коломоец Е.В., Левковский А.Е., Силла А.Л., Старшинов В.А., Щербакова С.А., Малеев В.В. Обеспечение биологической безопасности при проведении противоэпидемических мероприятий в период ликвидации эпидемии лихорадки Эбола в Гвинейской Республике. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018; 7(3):102–8. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-13015.
6. Лопатин А.А., Найденова Е.В., Сафонов В.А., Раздорский А.С., Уткин Д.В., Касьянов Ж.А., Крицкий А.А., Терновой В.А., Нестеров А.Е., Сергеев А.А., Силла А.Л., Капомоу В., Бирюков М.Я., Демина Ю.В., Хорошилов В.Ю., Попова А.Ю., Кутырев В.В. Изучение сохранения вируса Эбола в биологических жидкостях пациента на поздних стадиях выздоровления. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 3:73–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-3-73-76.
7. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Ликвидация эпидемии Эбола в Гвинейской Республике: опыт работы специализированной противоэпидемической бригады Роспотребнадзора. Ижевск: Принт-2; 2017. 388 с.
8. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Россия – Гвинея: итоги и перспективы сотрудничества в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Саратов: Амрит; 2020. 272 с.
9. Ицков Я.Ю., Коломоец Е.В., Кономов В., Найденова Е.В., Кейта С., Лама Р. Организация госпитальной сети для лечения больных COVID-19 в Гвинейской Республике. В кн.: Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Материалы Международной научно-практической конференции по вопросам противодействия новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям. Саратов: Амрит; 2020. С. 86.
10. Popova A.Yu., editor. New features of infection in the Republic of Guinea. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute; 2020. 212 p.
11. Ebola outbreak 2021 – N’Zerekore, Guinea. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/emergencies/situations/ebola-2021-nzerekore-guinea> (дата обращения 15.06.2021).

References

1. Interim infection prevention and control guidance for care of patients with suspected or confirmed Filovirus Hemorrhagic Fever in healthcare settings, with focus on Ebola. WHO/HIS/SDS/2014.4 Rev. 1. World Health Organization. URL: http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/filovirus_infection_control/en (Accessed: June 15, 2021).
2. Health worker Ebola infections in Guinea, Liberia and Sierra Leone. Preliminary report WHO. 2015. URL: http://www.who.int/hrh/documents/21may2015_web_final.pdf. (Accessed: June 15, 2021).

3. Maleev V.V., Tolno F., Konomov K.V., Sow T.I., Itskov Ya.Yu., Demina Yu.V., Levkovsky A.E., Kolomoets E.V., Kovalev G.A., Khoroshilov V.Yu., Omariev Z.M. Epidemiological peculiarities and clinical features of Ebola virus disease in the Republic of Guinea. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii. [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; 3:27–32. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-3-27-32.

4. Bezsmertny V.E., Bredikhin V.N., Koneva A.S., Panin Yu.A., Pozdnyakov I.V., Itskov Y.Yu., Kolomoets E.V., Levkovsky A.E. Experience in building infectious hospital for treatment of particularly dangerous infectious diseases in the Republic of Guinea. *Problems of Problemy Osobo Opasnykh Infektsii. [Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (3):13–15. (In Russ.) DOI: 10.21055/0370-1069-2015-3-13-15.

5. Naidenova E.V., Lopatin A.A., Safronov V.A., Kolomoets E.V., Levkovskiy A.E., Silla A.L., Starshinov V.A., Shcherbakova S.A., Maleev V.V. Biological safety at carrying out anti-epidemic measures during the liquidation of the Ebola fever pandemic in the Republic of Guinea. *Infektsionnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie. Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2018; 7(3):102–8. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-13015.

6. Lopatin A.A., Naidenova E.V., Safronov V.A., Razdorsky A.S., Utkin D.V., Kas'yan Zh.A., Kritsky A.A., Ternovoy V.A., Nesterov A.E., Sergeev A.A., Sylla A.L., Kanomou V., Boiro M.Y., Demina Yu.V., Khoroshilov V.Yu., Popova A.Yu., Kutyray V.V. Studies of Ebola virus persistence in the body fluids of patients at advanced stages of convalescence. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii. [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (3):73–76. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2015-3-73-76.

7. Popova A.Yu., Kutyray V.V., editors. Eradication of the Ebola Epidemic in the Republic of Guinea: Work of the Specialized Anti-Epidemic Team of the Rospotrebnadzor. Izhevsk: LLC "Print-2"; 2017.388 p.

8. Popova A.Yu., Kutyray V.V., editors. Russia – Guinea: Results and Prospects of Cooperation in the Field of Ensuring the Sanitary-Epidemiological Welfare of the Population. Saratov: "Amrit"; 2020.272 p.

9. Itskov Ya.Yu., Kolomoets E.V., Konomov V., Naidenova E.V., Keita S., Lamah R. Establishment of the hospital network for treatment of COVID-19 patients in the Republic of Guinea. In: Popova A.Yu., Kutyray V.V., editors. [Materials of the International Scientific and Practical Conference on the Issues of Combating New Coronavirus Infection and Other Infectious Diseases (December 9–10, 2020, St. Petersburg). Saratov: "Amrit"; 2020. P. 86.

10. Popova A.Yu., editor. New features of infection in the Republic of Guinea. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute; 2020. 212 p.

11. Ebola outbreak 2021 – N’Zerekore, Guinea. URL: <https://www.who.int/emergencies/situations/ebola-2021-nzerekore-guinea> (Accessed: June 15, 2021).

About the authors:

Kolomoets E.V., Itskov Ya.Yu. UC "RUSAL". 1, Vasilisa Kozhina St., Moscow, Russian Federation, 121096. E-mail: documents@rusal.com.

Naidenova E.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, Russian Federation, 410005. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Konomov V. Scientific Clinical-Diagnostic Center of Epidemiology and Microbiology. Republic of Guinea, Kindia.

Keita S., Lamah R. Ministry of Health of Guinea. Republic of Guinea, Conakry.

Об авторах:

Коломоц Е.В., Ицков Я.Ю. ОК «РУСАЛ», Российская Федерация, 121096, Москва, ул. Василисы Кожиной, 1. E-mail: documents@rusal.com.

Найденова Е.В. Российской научно-исследовательский противоэпидемиологический институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Кономов В. Научный клинико-диагностический центр эпидемиологии и микробиологии. Гвинейская Республика, г. Кинда.

Кеита С., Ламах Р. Министерство здравоохранения Гвинеи. Гвинейская Республика, г. Конакри.

**А.А. Крицкий¹, Н.И. Смирнова¹, Т.Б. Каляева², Н.Ф. Оброткина², И.В. Грачева¹, А.Д. Катышев¹,
В.В. Кутырев¹**

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* О1 БИОВАРА ЭЛЬ ТОР, ИЗОЛИРОВАННЫХ В РОССИИ И НА ЭНДЕМИЧНЫХ ПО ХОЛЕРЕ ТЕРРИТОРИЯХ

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российской Федерации;

²ФКУЗ «Элистинская противочумная станция», Элиста, Российской Федерации

Цель – сравнительный анализ молекулярно-генетических свойств нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* О1 биовара Эль Тор, изолированных в Республике Калмыкия и на эндемичных по холере территориях, и установление их филогенетических связей с токсигенными изолятами. **Материалы и методы.** Проведен биоинформационный анализ полногеномных последовательностей 60 штаммов холерных вибрионов из эндемичных по холере регионов и Калмыкии. Определено присутствие в их генах островов патогенности и пандемичности. Показаны их ST-типы и проведен полногеномный SNP-анализ. **Результаты и обсуждение.** Показано, что нетоксигенные холерные вибрионы Эль Тор, изолированные в Калмыкии, относятся к двум основным генотипам: *ctxA*⁻*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻ и *ctxA*⁻*tcpA*⁻*VPI-2Δ*⁺*VSP*⁻, где *VPI-2Δ*⁺ означает наличие делеций разной протяженности в геноме этого острова патогенности. Среди них лишь последние обнаружены в регионах, эндемичных по холере. Кроме того, в эндемичных очагах холеры циркулируют популяции вибрионов *ctxA*⁻*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁺, не обнаруженные в Калмыкии. Среди всех изученных штаммов выявлено 17 сиквенс-типов (по семи локусам генов «домашнего хозяйства»). Филогенетический анализ, проведенный с помощью SNP-типовирования, показал отсутствие тесной генетической связи вибрионов из Калмыкии *ctxA*⁻*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻ как с токсигенными, так и с нетоксигенными вибрионами с иным составом островов патогенности и пандемичности. В то же время выявлена генетическая близость холерных вибрионов *ctxA*⁻*tcpA*⁻*VPI-2Δ*⁺*VSP*⁻ из эндемичных очагов холеры с таковыми, изолированными в Калмыкии, что может указывать на возможность их периодического завоза на территорию России. Нетоксигенные штаммы *V. cholerae*, циркулирующие на территории Калмыкии, отличаются высоким генетическим разнообразием. Циркулирование штаммов уникальных сиквенс-типов позволяет сделать предположение об их способности к длительной персистенции на данной территории. Вместе с тем филогенетическая близость и идентичность некоторых штаммов со штаммами эндемичных территорий могут свидетельствовать о периодическом заносе.

Ключевые слова: нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* О1 Эль Тор, биоинформационный анализ, генотип, сиквенс-тип, SNP-типовирование.

Корреспондирующий автор: Крицкий Андрей Александрович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Крицкий А.А., Смирнова Н.И., Каляева Т.Б., Оброткина Н.Ф., Грачева И.В., Катышев А.Д., Кутырев В.В. Сравнительный анализ молекулярно-генетических свойств нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* О1 биовара Эль Тор, изолированных в России и на эндемичных по холере территориях. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 3:72–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-72-82.
Поступила 16.07.2021. Отправлена на доработку 01.09.2021. Принята к публ. 06.09.2021.

**A.A. Kritsky¹, N.I. Smirnova¹, T.B. Kalyaeva², N.F. Obrotkina², I.V. Gracheva¹, A.D. Katyshev¹,
V.V. Kutyrev¹**

Comparative Analysis of Molecular-Genetic Properties in Non-Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Strains Biovar El Tor, Isolated in Russia and on Cholera Endemic Territories

¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

²Elista Plague Control Station, Elista, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to perform a comparative analysis of molecular-genetic properties in non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains biovar El Tor, isolated in the Republic of Kalmykia and on cholera endemic territories and to reveal their phylogenetic relations to toxigenic isolates. **Materials and methods.** We have carried out bio-information analysis of whole genome sequences of 60 cholera vibrio strains from endemic as regards cholera regions and from Kalmykia. The presence of pathogenicity and endemicity islands in their genomes has been determined. Specified have been the sequence-types of the examined strains and whole genome SNP-analysis conducted. **Results and discussion.** Non-toxigenic El Tor vibrios circulating in Kalmykia are clustered into two major genotypes: *ctxA*⁻*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻ and *ctxA*⁻*tcpA*⁻*VPI-2Δ*⁺*VSP*⁻, where *VPI-2 Δ*⁺ signifies the presence of deletions of varying length in the genome of this pathogenicity island. Only the latter one is found in regions endemic for cholera. In addition, *ctxA*⁻*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁺ populations circulate in cholera endemic foci, not found in Kalmykia. 17 sequence-types were identified among the studied strains (by seven housekeeping gene loci). Phylogenetic analysis performed using SNP-typing demonstrated the absence of close genetic relation between the *ctxA*⁻*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻ vibrios from Kalmykia and both toxigenic and non-toxigenic vibrios with different composition of pathogenicity and pandemicity islands in the genome. At the same time, genetic proximity of *ctxA*⁻*tcpA*⁻*VPI-2Δ*⁺*VSP*⁻ cholera vibrios from endemic cholera foci with those isolated in Kalmykia was detected, which may indicate the possibility of their recurrent importation into the territory of Russia. Non-toxigenic *V. cholerae* strains found in the territory of Kalmykia are characterized by a high genetic diversity.

Circulation of the strains with unique sequence-types suggests their potential for long-term persistence on this territory. At the same time, phylogenetic closeness and identity of certain strains with strains from endemic territories can be an evidence of repeated importation.

Key words: non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains; bio-information analysis; genotype; sequence-type; SNP-typing.

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

Corresponding author: Andrey A. Kritsky, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kritsky A.A., Smirnova N.I., Kalyaeva T.B., Obrotkina N.F., Gracheva I.V., Katyshev A.D., Kutyrev V.V. Comparative Analysis of Molecular-Genetic Properties in Non-Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Strains Biovar El Tor, Isolated in Russia and on Cholera Endemic Territories. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:72–82. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-72-82.

Received 16.07.2021. Revised 01.09.2021. Accepted 06.09.2021.

Kritsky A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>
 Smirnova N.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7115-6286>
 Kalyaeva T.B., ORCID: <https://orcid.org/000-0002-89455-920x>
 Obrotkina N.F., ORCID: <https://orcid.org/000-0001-6841-4531>

Gracheva I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6757-6977>
 Katyshev A.D., ORCID: <https://orcid.org/00002-8260-4670>
 Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

К холерным вибрионам серогруппы O1 биовара Эль Тор относятся штаммы разной эпидемической значимости. Эпидемически опасные штаммы *Vibrio cholerae* O1 Эль Тор вызвали седьмую пандемию холеры – острой диарейной особо опасной инфекционной болезни, которая началась в 1961 г. и продолжается до сих пор, ее эндемичные очаги сформированы на территории многих стран Азии и Африки [1–3].

Патогенный потенциал возбудителя холеры обусловлен присутствием в его геноме мобильных элементов с генами токсин-корегулируемых пилей, расположенных на острове патогенности VPI-1 (от *Vibrio Pathogenic Island*), и холерного токсина, входящего в состав профага CTX ϕ , продукты которых определяют развитие инфекционного процесса [4, 5]. Кроме того, в их геноме присутствует второй остров патогенности – VPI-2, содержащий гены, усиливающие действие холерного токсина и значимые для выживания вибрионов в разных экологических нишах [6]. Эпидемический потенциал возбудителя обеспечивают два острова пандемичности – VSP-I (от *Vibrio Seventh Pandemic*) и VSP-II [7]. Появление эпидемически опасных штаммов на территории России, вызвавших локальные вспышки либо единичные случаи холеры, связано с их заносом из эндемичных по холере стран. Существование их в различных объектах окружающей среды, как правило, ограничено коротким периодом времени в период вспышек [3]. В отличие от этих вариантов, нетоксигенные вибрионы Эль Тор, способные вызывать острые кишечные инфекции, могут длительное время циркулировать в поверхностных водоемах России [2].

Нетоксигенные холерные вибрионы, изолированные в России и не имеющие островов пандемичности, генетически разнообразны и четко дифференцируются на две группы в зависимости от присутствия в геноме острова патогенности VPI-1, содержащего кластер генов *tcpA-F*, кодирующих токсин-корегулируемые пили, обеспечивающие прикрепление вибриона к слизистой оболочке кишечника человека [8]. Вибрионы, содержащие в геноме VPI-1, относятся к генотипу *ctxA-tcpA⁺*, вибрионы, лишенные этого участка ДНК, имеют генотип *ctxA-tcpA⁻*. Вместе с тем в водных экосистемах эн-

демичных по холере регионов регистрируется постоянное присутствие нетоксигенных вибрионов, имеющих как острова патогенности, так и острова пандемичности [8–10].

Молекулярно-генетические свойства токсигенных и нетоксигенных холерных вибрионов являются предметом интенсивных исследований отечественных [11–15] и зарубежных [16–19] исследователей, которые для их филогенетического анализа использовали разные методы молекулярного типирования [9, 12, 15, 20–23]. В России, не имеющей эндемичных очагов холеры, нетоксигенные вибрионы наиболее часто обнаруживаются в открытых водоемах Южного федерального округа. Наибольшее число таких вибрионов выделено в Республике Калмыкия, на территории которой имеются благоприятные условия для их сохранения в поверхностных водоемах. Так, за период с 1989 по 2015 год на территории Калмыкии выделено 314 штаммов холерного вибриона O1 серогруппы, что составляет 33,5 % от общероссийского показателя за данный временной период [11]. Однако, несмотря на проведенные исследования генетических свойств отдельных штаммов нетоксигенных вибрионов из Калмыкии [11, 13, 14], вопрос об особенностях структуры их генома и происхождении до сих пор остается открытым. Один из путей решения этого вопроса – сопоставление структуры генома нетоксигенных вибрионов, выделенных в Калмыкии, с таковой у изолированных на эндемичных по холере территориях, а также установление филогенетического родства как между ними, так и с токсигенными изолятами.

Цель работы – сравнительный анализ молекулярно-генетических свойств нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированных в Республике Калмыкия и на эндемичных по холере территориях, а также установление их филогенетических связей с токсигенными изолятами.

Материалы и методы

В работе использовали полногеномные нуклеотидные последовательности 60 токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы

биовара Эль Тор, изолированных в период с 1930 по 2018 год, включая депонированные нами ранее последовательности 29 нетоксигенных штаммов, выделенных на территории Калмыкии [24], и четырех токсигенных изолятов, занесенных в Россию. Присутствие в их геноме островов патогенности и пандемичности определяли при помощи программ Mauve версии 2.4.0 с валидацией в программе Blast2Go версии 5.2 относительно генома референсного Эль Тор штамма N16961.

Сиквенс-типы исследованных штаммов определяли с использованием онлайн-сервиса MLST 2.0 (Multilocus Sequence Typing) на платформе CGE (Center Genomic Epidemiology) путем анализа нуклеотидных последовательностей семи генов «домашнего хозяйства»: *adk*, *gyrB*, *mdhI*, *metE*, *pntA*, *purM*, *pyrC*.

SNP-типирование. Поиск коровых SNPs в геноме проводили при помощи программы Wombac 2.0, используя в качестве референсной полногеномную последовательность штамма N16961. Построение филогенетического дерева по рассчитанной матрице коровых SNPs осуществляли в программе Ugene V.1.32. методом Maximum Likelihood, используя параметрическую модель замен GTR (General Time Reversible). Оценка достоверности топологии построенного дерева осуществлялась при помощи bootstrap-теста с числом итераций 1000.

Результаты и обсуждение

Для того чтобы понять происхождение нетоксигенных холерных вибрионов биовара Эль Тор, выявляемых на территории Республики Калмыкия, провели сравнение их секвенированных полных геномов с таковыми нетоксигенных вибрионов того же биовара, циркулирующими в эндемичных регионах различных стран Юго-Восточной Азии. Использовали полногеномные нуклеотидные последовательности 21 штамма *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированного в 1973–2011 гг. от людей или из внешней среды в период текущей пандемии холеры в Индии, Бангладеш, Таиланде и Китае, а также двух нетоксигенных предпандемических штаммов, выделенных от людей в 1930 и 1937 гг. (таблица). Что касается территории Калмыкии, то в исследование включены секвенированные нами ранее геномы 29 нетоксигенных штаммов [24], изолированных в 2009–2011 гг. в основном из воды поверхностных водоемов, расположенных в черте Элиста, включая пруды Заячий, Колонский и реку Элистинку. Лишь один штамм выделен в Элисте от больного острым инфекционным гастроэнтеритом.

Биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов 21 нетоксигенного штамма из эндемичных регионов, изолированного в период текущей пандемии холеры, позволил разделить их на две основные группы. В первую вошли 12 штаммов (или 57,1 % от числа изучен-

ных), в геноме которых присутствовали два острова патогенности: VPI-1 (41,3 т.п.н.) с геном *tcpA* и интактный VPI-2 (57,3 т.п.н.). Кроме того, геномы этих штаммов несли острова пандемичности VSP-I (16,0 т.п.н.) и VSP-II (26,6 т.п.н.), определяющие их эпидемический потенциал. Их генотип обозначен как *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺ (группа «а»). Вторая группа, состоящая из шести штаммов (28,6 %), отличалась от первой по составу мобильных элементов. У этих штаммов отсутствовали VPI-1 и оба острова пандемичности, а в VPI-2 обнаружены делеции разной протяженности (37,9–54,9 т.п.н.), которые затронули 19–41 ген. Такой остров патогенности, геном которого лишен ряда генов, получил обозначение VPI-2Δ. Их генотип был *ctxA*⁻*tcpA*⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻ (группа «б»). Кроме штаммов с указанными генотипами обнаружили три штамма (или 14,3 %), отличающиеся от указанных изолятов по составу мобильных элементов. Эти штаммы вошли в состав третьей гетерогенной группы («в»), включающей в себя три подгруппы («в1», «в2», «в3» соответственно) с разным генотипом: *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ (V5), *ctxA*⁻*tcpA*⁻VPI-2⁺VSP⁺ (305AD1697) и *ctxA*⁻*tcpA*⁻VPI-2⁺VSP⁻ (TC183) (таблица). Помимо штаммов, выделенных в период текущей пандемии холеры, для сравнения взяты два нетоксигенных предпандемических штамма (NCTC8457 и NCTC5395) с генотипом *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ (таблица).

Таким образом, результаты проведенного анализа указали на большое генетическое разнообразие изученных нетоксигенных штаммов, различающихся между собой по составу мобильных элементов с генами патогенности и пандемичности и относящихся к пяти разным генотипам. При этом значительное число нетоксигенных штаммов (57,1 %), выделенных в эндемичных по холере регионах, имели большое сходство с токсигенными штаммами по содержанию генов патогенности и пандемичности.

В отличие от этих регионов, на территории Калмыкии в период с 2009 по 2018 год среди 29 исследуемых штаммов не выявлено нетоксигенных с интактными островами пандемичности, имеющих генотип *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺. Изученные штаммы входили в состав двух основных групп, различающихся друг от друга по набору мобильных элементов. Значительная часть штаммов – 16 из 29 (или 55,2 %) – лишена VPI-1 с геном *tcpA*, но имела делетированный VPI-2 и относилась к тому же генотипу *ctxA*⁻*tcpA*⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻, что и штаммы группы «б» из эндемичных регионов. Другая группа представлена 12 изолятами (или 41,4 % от числа исследованных из этого региона) и, в отличие от штаммов группы «б», содержала в геноме интактные острова патогенности. Поскольку их генотип *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ не отличался от такого нетоксигенного изолятта V5 из эндемичного по холере региона, входящего в состав подгруппы «в1», то эти изоляты также отнесены к той же подгруппе (таблица). Кроме того, среди штаммов *tcpA*⁺ обнаружен один изолят M1501

Штаммы *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, полногеномные нуклеотидные последовательности которых использованы в работе
Strains of *Vibrio cholerae* O1, biovar El Tor, whole-genome sequences of which are used in this work

Штамм Strains	Место, источник и год выделения Site, source, and the year of isolation	Код доступа GenBank GenBank access No	Генотип/группа Genotype/group	ST
1	2	3	4	5
Нетоксигенные предпандемические штаммы Non-toxigenic pre-pandemic strains				
NCTC8457	Египет, человек, 1930 Egypt, patient, 1930	AAWD00000000	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /b1	71
NCTC5395	Ирак, человек, 1937 Iraq, patient, 1937	CP013317/CP013318	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /b1	71
Токсигенные штаммы, седьмая пандемия Toxigenic strains, 7 th pandemic				
N16961	Бангладеш, человек, 1975 Bangladesh, patient, 1957	NC_002505.1, NC_002506.1	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
CRC1106	Индия, человек, 1962 India, patient, 1962	NZ_CP013305.1, NZ_CP013306.1	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
2044	Ирак, человек, 1966 Iraq, patient, 1966	PXZC01000000	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
6/67	Индия, человек, 1967 India, patient, 1967	LRFF00000000	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
M888	СССР, человек, 1970 USSR, patient, 1970	LRBH00000000	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
M1275	РФ, человек, 1993 RF, patient, 1993	LRAF00000000	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
P18889	РФ, человек, 2006 RF, patient, 2006	LAKM00000000	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
L3226	РФ, человек, 2010 RF, patient, 2010	JDVX00000000	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
Нетоксигенные штаммы из эндемичных по холере территорий Non-toxigenic strains from cholera endemic territories				
GP60	Индия, человек, 1973 India, patient, 1973	CWQU00000000	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
349_264	Таиланд, человек, 1983 Thailand, patient, 1983	ERS1228659	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
476_167	Таиланд, человек, 1983 Thailand, patient, 1983	ERS1228661	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
816ct634	Таиланд, человек, 1984 Thailand, patient, 1984	ERS1228662	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
184AD112	Таиланд, человек, 1985 Thailand, patient, 1985	ERS1228664	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
501_771	Таиланд, человек, 1985 Thailand, patient, 1985	ERS1228663	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
305AD1697	Таиланд, человек, 1985 Thailand, patient, 1985	ERS1228665	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /B2	69
V5	Индия, н/и, 1989 India, n.k., 1989	CWNT00000000	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /b1	69
857	Бангладеш, в/с, 1996 Bangladesh, a.e., 1996	MIKH00000000	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /6	382
MBRN14	Индия, н/и, 2004 India, n.k., 2004	CWNR00000000	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
TC22	Таиланд, в/с, 2006 Thailand, a.e., 2006	ERS1228673	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /6	183
TC183	Таиланд, в/с, 2006 Thailand, a.e., 2006	ERS1228734	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /b3	184
4053024303	Таиланд, человек, 2010 Thailand, patient, 2010	ERS1228717	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
P47	Таиланд, человек, 2011 Thailand, patient, 2011	ERS1228692	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
NHCM_017	Бангладеш, человек, 2011 Bangladesh, patient, 2011	LGOK00000000	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
471352	Бангладеш, в/с, 2011 Bangladesh, a.e., 2011	NOJT00000000	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /a	69
MK14	Таиланд, в/с, 2011 Thailand, a.e., 2011	ERS1228694	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /6	178
4T5	Таиланд, в/с, 2011 Thailand, a.e., 2011	ERS1228695	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /6	186
S023208	Бангладеш, в/с, 2014 Bangladesh, a.e., 2014	NTBY00000000	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /a	69

Окончание таблицы / Ending of the Table

1	2	3	4	5
EL2313	Китай, человек, 1992 China, patient, 1992	VMPJ00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	164
EL2398	Китай, человек, 1996 China, patient, 1996	VMOM00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	744
Нетоксигенные штаммы из Республики Калмыкия Non-toxigenic strains from the Republic of Kalmykia				
M1457	РФ, Элиста, в/с, 2009 RF, Elista, a.e., 2009	VTLH00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	178
M1467	РФ, Элиста, в/с, 2010 RF, Elista, a.e., 2010	VTLI00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	776
M1506	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VTZX00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	776
M1501	РФ, Элиста, человек, 2011 RF, Elista, patient, 2009	LRAE00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/г</i>	75
M1504	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VTLN00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2⁺VSP⁻/в1</i>	75
M1505	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VTLO00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2⁺VSP⁻/в1</i>	75
M1507	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VTLP00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2⁺VSP⁻/в1</i>	75
111	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VTLQ00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2⁺VSP⁻/в1</i>	75
M1519	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VUAD00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2⁺VSP⁻/в1</i>	75
M1527	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VUAE00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2⁺VSP⁻/в1</i>	75
M1517	РФ, Элиста, в/с, 2012 RF, Elista, a.e., 2012	VTZZ00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	167
29	РФ, Элиста, в/с, 2012 RF, Elista, a.e., 2012	VUAB00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	931
M1516	РФ, Элиста, в/с, 2012 RF, Elista, a.e., 2012	VTZY00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	233
M1526	РФ, Элиста, в/с, 2012 RF, Elista, a.e., 2012	VUAA00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	233
M1518	РФ, Элиста, в/с, 2012 RF, Elista, a.e., 2012	LQZR00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	75
132	РФ, Элиста, в/с, 2013 RF, Elista, a.e., 2013	VUAC00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	776
85	РФ, Элиста, в/с, 2013 RF, Elista, a.e., 2013	VUAF00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	776
M1524	РФ, Элиста, в/с, 2013 RF, Elista, a.e., 2013	LQZS00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2⁺VSP⁻/в1</i>	75
8	РФ, Элиста, в/с, 2014 RF, Elista, a.e., 2014	PYCF00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	776
2613	РФ, Элиста, в/с, 2015 RF, Elista, a.e., 2015	PYCA00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2⁺VSP⁻/в1</i>	75
2687	РФ, Элиста, в/с, 2015 RF, Elista, a.e., 2015	PYCB00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2⁺VSP⁻/в1</i>	75
2688	РФ, Элиста, в/с, 2015 RF, Elista, a.e., 2015	PYCC00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2⁺VSP⁻/в1</i>	75
2843	РФ, Элиста, в/с, 2016 RF, Elista, a.e., 2016	PYCG00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	744
3178	РФ, Элиста, в/с, 2017 RF, Elista, a.e., 2017	PYCH00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	760
124	РФ, Элиста, в/с, 2017 RF, Elista, a.e., 2017	PYCD00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2⁺VSP⁻/в1</i>	75
120	РФ, Элиста, в/с, 2018 RF, Elista, a.e., 2018	VTLI00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	776
136	РФ, Элиста, в/с, 2018 RF, Elista, a.e., 2018	VTLK00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	406
2439	РФ, Элиста, в/с, 2018 RF, Elista, a.e., 2018	VTLL00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	620
3017	РФ, Элиста, в/с, 2018 RF, Elista, a.e., 2018	VTLM00000000	<i>ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻/6</i>	620

Примечание: н/и – неизвестно; в/с – внешняя среда; ST – сиквенс-тип.

Note: n.k. – not known; a.e. – ambient environment; ST – sequence type.

(или 3,4 %) с иным генотипом (*ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI- Δ ⁺VSP⁻), что позволило отнести его к другой подгруппе – «г» (таблица). Таким образом, нетоксигенные вибрионы Эль Тор, выявленные на территории Калмыкии, генетически разнообразны, так же как и вибрионы, изолированные в эндемичных по холере регионах. Однако основные генотипы штаммов, изолированных на разных по эндемичности холеры территориях, различны.

Для установления филогенетических связей между штаммами из Калмыкии и эндемичных по холере регионов проведены их мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) на основании анализа нуклеотидной последовательности семи генов «домашнего хозяйства» (*adk*, *gyrB*, *mdhI*, *metE*, *rntA*, *rurM*, *pyrC*), а также SNP-анализ коровой части геномов.

По результатам мультилокусного сиквенс-типирования среди 50 нетоксигенных штаммов, выделенных в период текущей пандемии холеры на указанных территориях, выявлено 17 сиквенс-типов, или ST (от sequence type). Холерные вибрионы, циркулирующие на эндемичных по холере территориях, относились к восьми сиквенс-типам: 69, 164, 178, 183, 184, 186, 382 и 744. Заслуживает внимания тот факт, что все 12 штаммов с генотипом *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI- Δ ⁺VSP⁻, входящие в группу «а», вне зависимости от года и места выделения, имели единый ST69, характерный для всех изученных токсигенных штаммов, включая референсный N16961 (таблица). К этому же ST относились и два штамма с генотипами *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI- Δ ⁺VSP⁻ (V5, подгруппа «в1») и *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI- Δ ⁺VSP⁻ (305AD1697, подгруппа «в2»). В то же время шесть штаммов *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI- Δ ⁺VSP⁻ (группа «б») принадлежали к шести разным ST (164, 178, 183, 186, 382 и 744), что указывает на значительный полиморфизм их генов «домашнего хозяйства».

Что касается штаммов из Калмыкии, то среди 29 изолятов выявлено десять ST, из которых семь (167, 233, 406, 620, 760, 776, 931) обнаружили только среди холерных вибрионов, циркулирующих на этой территории. Важно отметить, что все 12 штаммов из Калмыкии, имеющие генотип *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI- Δ ⁺VSP⁻ и входящие в состав подгруппы «в1», относились к одному ST75. В то же время значительная часть штаммов (16 изолятов, группа «б») с генотипом *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI- Δ ⁺VSP⁻ принадлежала к девяти разным ST: семи специфичным для этой территории (167, 233, 406, 620, 760, 776, 931) и двум (178 и 744), встречающимся у штаммов с эндемичных территорий в Китае и Таиланде (таблица).

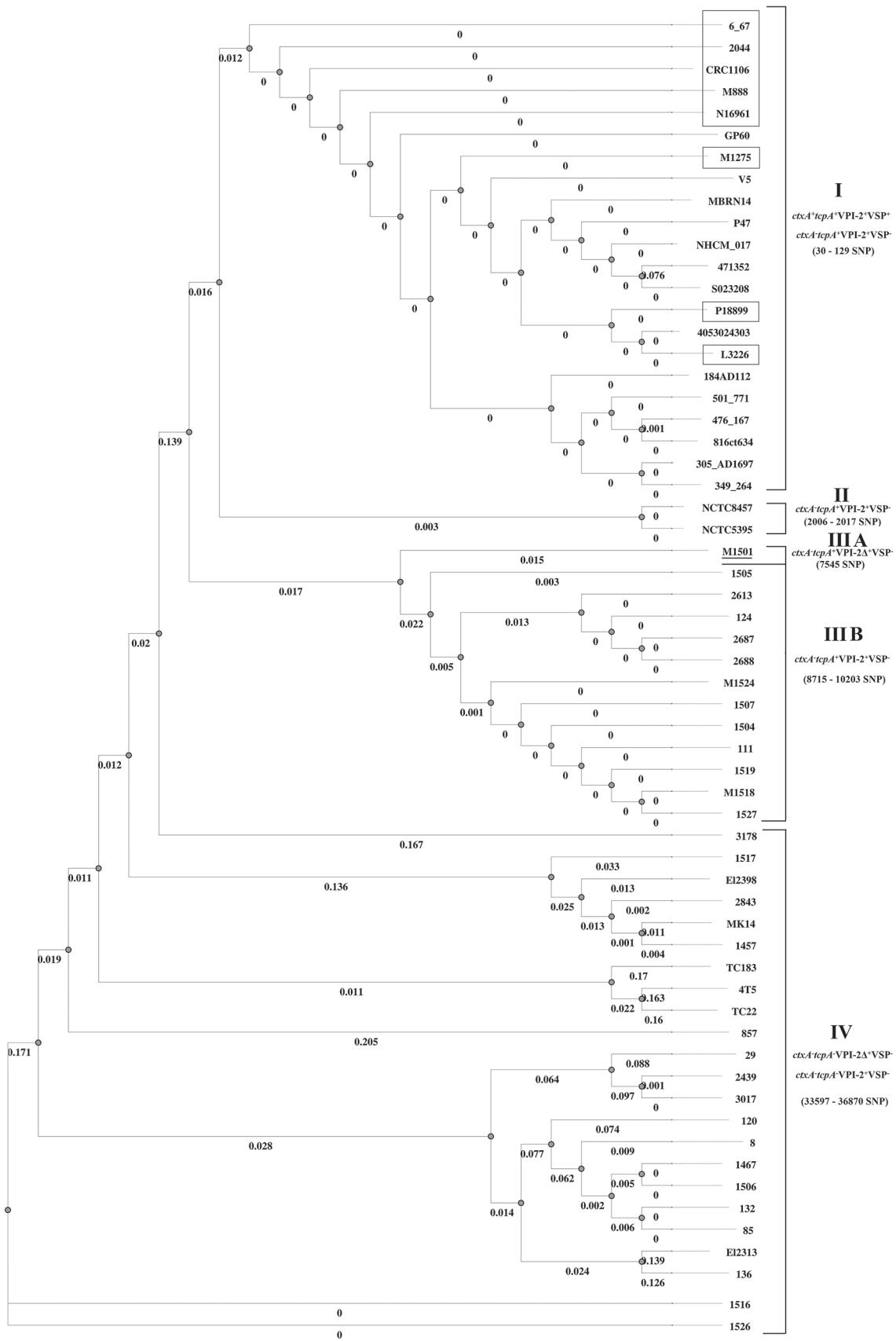
Далее проведен полногеномный SNP-анализ 60 штаммов. При сравнении нуклеотидных последовательностей их геномов с референсным N16961 в коровых генах обнаружили 87724 одиночных нуклеотидных замены (SNPs). На основе их анализа построено филогенетическое дерево, на котором видно деление на четыре основных кластера (рисунок). В кластер I вошли 14 нетоксигенных штаммов, изо-

лированных на эндемичных территориях в различные годы и относящихся к ST69. Из них 12 штаммов (или 85,7 %) имели генотип *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI- Δ ⁺VSP⁻ и лишь 2 штамма отличались отсутствием либо острота патогенности VPI-1 с геном *tcpA* (305AD1697), либо интактных островов пандемичности VSP (V5) (таблица). Тем не менее все эти штаммы имели тесную филогенетическую связь с токсигенными *V. cholerae* биовара Эль Тор, о чем свидетельствует присутствие в данном кластере всех изученных токсигенных штаммов. Различия всех токсигенных и нетоксигенных штаммов этого кластера с референсным составили 30–129 SNPs. Лишь последовательность одного из них (471352) отличалась от референсной на 9317 SNPs. В целом отличия нуклеотидной последовательности нетоксигенных штаммов от токсигенных незначительны, что подтверждает их филогенетическую близость.

Кластер II состоял из двух предпандемических штаммов *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI- Δ ⁺VSP⁻, имеющих иной ST71. Их отличия от референсного более значимы – 2006–2017 SNPs (рисунок).

Нетоксигенные штаммы, лишенные интактных островов пандемичности VSP, вошли в состав двух других кластеров – III и IV. При этом III кластер (13 изолятов), состоящий из подкластеров IIIА и IIIВ, сформирован штаммами, изолированными только на территории Калмыкии в разные годы (2011–2017 гг.) и несущими в геноме оба острова патогенности. Все эти штаммы имели единый генотип *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI- Δ ⁺VSP⁻ и относились к одному и тому же ST75 (рисунок). От токсигенного референсного эти изоляты отличались большим числом SNPs (7545–10203) по сравнению с токсигенными и нетоксигенными штаммами из кластера I (30–129). Такая удаленность нетоксигенных штаммов этого кластера от токсигенных и их производных может указывать на их независимое происхождение либо очень давнюю дивергенцию от токсигенных.

Все нетоксигенные штаммы с генотипом *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI- Δ ⁺VSP⁻, выявленные как в Калмыкии, так и на эндемичных по холере территориях, и относящиеся к разным ST, вошли в состав кластера IV. Данный кластер включал в себя 23 штамма, изолированных как в Калмыкии (16 штаммов), так и в эндемичных по холере регионах (7 штаммов из Таиланда, Китая, Бангладеш). Значительные различия между ними и всеми указанными выше штаммами состояли в отсутствии в их геноме VPI-2 с геном *tcpA* и наличии VPI- Δ с делециями разной протяженности. Исключением был лишь один штамм TC183 из Таиланда, в геноме которого присутствовал интактный VPI-2. Более того, отличительная особенность штаммов этого кластера заключалась в большом разнообразии их сиквенс-типов. Несмотря на практически единственный генотип (*ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI- Δ ⁺VSP⁻), выявлено девять ST (167, 178, 233, 406, 620, 744, 760, 776, 931) у штаммов из Калмыкии и семь (164, 178, 183, 184, 186, 382, 744) среди штаммов из эндемичных по



Филогенетические связи между нетоксигенными штаммами *V. cholerae* O1 Эль Тор, выделенными в Калмыкии, с различными нетоксигенными и токсигенными штаммами, изолированными на эндемичных по холере территориях, по данным MLST-анализа

Phylogenetic relations between non-toxigenic *V. cholerae* O1 El Tor strains isolated in Kalmykia and with various non-toxigenic and toxigenic strains isolated in cholera endemic areas, according to MLST analysis

холере регионов (таблица, рисунок). Присутствие в кластере IV нетоксигенных штаммов из Калмыкии, имеющих один и тот же генотип (*ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-Δ⁺VSP⁻) и сиквенс-тип (776), но выделенных в разные годы (2010–2018 гг.), указывает на возможность их длительного сохранения в различных водоемах на этой территории. Вместе с тем локализация в данном кластере указанных нетоксигенных штаммов с эндемичных и неэндемичных по холере территорий позволяет говорить об их филогенетической связи. Отличия штаммов IV кластера как от референсного, так и от штаммов из других кластеров оказались наиболее значимыми и составили 33597–36870 SNPs (рисунок). Эти данные подтверждают их явную филогенетическую обосновленность.

Таким образом, результаты молекулярного типирования методом SNP-анализа показали, что нетоксигенные штаммы, изолированные в период седьмой пандемии холеры, разделились на три филогенетически обосновленных кластера (I, III, IV). В эндемичных очагах холеры циркулируют разные популяции холерных вибрионов. Одни из них имеют тесную генетическую связь с токсигенными, циркулирующими лишь в эндемичных по холере регионах (кластер I), другие филогенетически близки с нетоксигенными штаммами из Калмыкии (кластер IV). В то же время установлено, что для Калмыкии характерно присутствие нетоксигенных штаммов с генотипом *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻, отличающихся от токсигенных и других нетоксигенных изолятов по ST и числу SNPs (кластер III).

Ежегодное выделение нетоксигенных холерных вибрионов серогруппы O1 биовара Эль Тор из открытых водоемов Республики Калмыкия на протяжении более 45 лет (с 1974 г. по настоящее время) ставит вопрос об особенностях структуры их генома и происхождении. Ранее при ПЦР-тестировании 14 различных генов показано генетическое разнообразие нетоксигенных штаммов с этой территории [25]. Анализ их полных геномов показал, что по составу мобильных элементов с генами патогенности и пандемичности нетоксигенные штаммы из Калмыкии также разнообразны. Они входят в состав двух основных групп с генотипами *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ и *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2Δ⁺VSP⁻. В эндемичных очагах холеры популяции холерных вибрионов также генетически гетерогенны и, помимо токсигенных, включали в себя нетоксигенные изоляты двух генотипов: *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺ и *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2Δ⁺VSP⁻ (таблица). Эти данные совпадают с результатами анализа популяционной структуры холерных вибрионов в Китае, Таиланде, Индии, Бангладеш, полученными другими исследователями [9, 10, 17, 19].

Из сравнения генотипов нетоксигенных штаммов на двух типах территорий следует, что, в отличие от Калмыкии, в регионах, эндемичных по холере, циркулируют популяции вибрионов *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺, которые различаются с токсигенными лишь отсутствием в их геноме генов холерного

токсина. Другое важное различие между сравниваемыми регионами – присутствие в Калмыкии водных популяций с генотипом *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻, не обнаруженных в странах Юго-Восточной Азии. Следует отметить, что такие вибрионы также выделены из поверхностных водоемов ряда других регионов России: в Алтайском и Хабаровском краях, Ростовской области [8, 11, 13, 24]. Этот факт может служить указанием на определенную приуроченность генотипа *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ к благополучной по холере территории. В то же время в Калмыкии и в эндемичных по холере странах присутствовали популяции холерных вибрионов с общим генотипом *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2Δ⁺VSP⁻. Таким образом, географическая разобщенность мест обитания холерных вибрионов в Юго-Восточной Азии и Калмыкии, а также различные экологические условия их существования обусловили их генетическое разнообразие.

Основной вопрос генетического разнообразия нетоксигенных вибрионов Эль Тор – их способность к реверсии в токсигенные эпидемически опасные клоны. Результаты проведенного исследования указали на принципиальные различия по этому свойству между нетоксигенными вибрионами из сравниваемых территорий. В эндемичных по холере регионах циркулируют популяции нетоксигенных вибрионов *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺, которые могут представлять потенциальную эпидемическую опасность. Присутствие генов *tcpA* в составе VPI-1 определяет реальную возможность приобретения ими генов холерного токсина в результате фаговой конверсии, а наличие интактных островов пандемичности может обеспечить им эпидемический потенциал. Напротив, циркулирующие в Калмыкии холерные вибрионы *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2Δ⁺VSP⁻ и *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ являются эпидемически безопасными вследствие отсутствия островов пандемичности и неспособности вызывать развитие холерной инфекции, что показано нами ранее в экспериментах на модельных животных [25].

Другой не менее важный вопрос – происхождение нетоксигенных холерных вибрионов Эль Тор, выделяемых из водоемов Калмыкии. Для его понимания построено филогенетическое дерево на основе анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей 52 нетоксигенных и 8 токсигенных штаммов, изолированных как в Калмыкии, так и на территориях, эндемичных по холере. Значительная часть их из эндемичных регионов (кластер I), имеющих генотип *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺ и относящихся к единому ST69, являются, видимо, производными токсигенных. Такие изоляты не обнаружены в Калмыкии. Вместе с тем установлено, что на территориях обоих типов циркулируют нетоксигенные вибрионы *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2Δ⁺VSP⁻, которые входят в состав одного и того же кластера IV, хотя относятся к 14 разным ST. Сопоставление нуклеотидных последовательностей полных геномов 23 нетоксигенных штаммов *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2Δ⁺VSP⁻ (кластер

IV) также указало на их большое генетическое разнообразие и выраженную филогенетическую обособленность от токсигенных, различия с которыми составляли 33597–36870 SNPs. Этот вывод совпадает с результатами SNP-анализа холерных вибрионов с таким генотипом других исследователей [9, 10, 22]. Данная явно филогенетически обособленная группа нетоксигенных холерных вибрионов, видимо, может иметь независимое происхождение, сформировавшись на ранних этапах эволюции *V. cholerae* O1. Наибольший интерес представляет тот факт, что для Калмыкии характерны штаммы *ctxA*⁺*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁺, принадлежащие к ST75 и образующие отдельный кластер III, значительно отличающийся как от кластера I токсигенных вибрионов и их производных (на 7545–10203 SNPs), так и от нетоксигенных изолятов из кластера IV (на 26052–26677 SNPs). Выявленная филогенетическая обособленность таких изолятов из Калмыкии полностью совпадает с результатами MLST-типирирования холерных вибрионов с тем же генотипом *ctxA*⁺*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁺, изредка выделяемых в других регионах России [26]. Следует отметить, что штаммы данного сиквенс-типа выделялись также в водоемах Сибири и Дальнего Востока и имели завозное происхождение [27].

Происхождение этих вибрионов остается неясным. Можно лишь предполагать, что они являются промежуточной филогенетической линией, образованной в процессе эволюционного формирования токсигенных клонов. Последующее приобретение ими через горизонтальный перенос новых мобильных элементов вирулентности и пандемичности, вероятно, могло привести к образованию эпидемически опасного клона.

Экологические особенности водоемов Республики Калмыкия могли способствовать длительному переживанию нетоксигенных вибрионов на этой территории. Вместе с тем, по всей видимости, происходит и периодический занос холерных вибрионов *ctxA*⁺*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁺ в Калмыкию из регионов, эндемичных по холере. Основным аргументом в пользу такой возможности является наличие у ряда штаммов из Калмыкии не только общего генотипа с некоторыми изолятами из Юго-Восточной Азии, но и сиквенс-типа. Эти данные согласуются с результатами других исследователей, полученными при использовании ПЦР-анализа [24].

Таким образом, показано большое генетическое разнообразие изученных нетоксигенных штаммов по составу мобильных элементов с генами патогенности и пандемичности. Установлено, что нетоксигенные холерные вибрионы Эль Тор, циркулирующие на эндемичных по холере территориях, относятся к двум основным генотипам: *ctxA*⁺*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁺ и *ctxA*⁺*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻. В отличие от них, на территории Калмыкии за исследуемый период не выделено ни одного нетоксигенного штамма с интактными остройками пандемичности. Вместе с тем установлено присутствие в Калмыкии популяций холерных ви-

брионов как со специфическим генотипом *ctxA*⁺*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻, так и с общим для эндемичных и неэндемичных по холере территорий генотипом *ctxA*⁺*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻. Результаты SNP-типирирования показали, что холерные вибрионы, имеющие генотип *ctxA*⁺*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻ и циркулирующие на территориях обоих типов, филогенетически близки друг с другом, но обособлены от токсигенных штаммов. Установлено, что холерные вибрионы *ctxA*⁺*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻ образуют отдельный кластер, удаленный как от токсигенных, так и от нетоксигенных изолятов *ctxA*⁺*tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻. Тем не менее этот кластер филогенетически более близок с токсигенными по сравнению с указанными выше нетоксигенными изолятами. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что нетоксигенные *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, способные, видимо, к длительному сохранению в водоемах Калмыкии, являются эпидемически безопасными.

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

Список литературы

1. 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–E7739. DOI: 10.1073/pnas.1608732113.
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. Миронова Л.В. Современные представления о закономерностях эпидемического процесса при холере: экологические и молекулярно-биологические аспекты. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2018; 23(5):242–50. DOI: 10.18821/1560-9525-2018-23-5-242-250.
4. Karaolis D.K., Johnson J.A., Bailey C.S., Boedeker E.C., Kaper J.B., Reeves P.R. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998; 95(6):3134–9. DOI: 10.1073/pnas.95.6.3134.
5. Waldor M.K., Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*. 1996; 272(5270):1910–4. DOI: 10.1126/science.272.5270.1910.
6. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxicigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology (Reading)*. 2002; 148(Pt 11):3681–93. DOI: 10.1099/00221287-148-11-3681.
7. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002; 99(3):1556–61. DOI: 10.1073/pnas.042667999.
8. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Баранихина Е.Ю., Краснов Я.М., Агафонов Д.А., Кутырев В.В. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью. *Генетика*. 2016; 52(9):1029–41. DOI: 10.7868/S0016675816060126.
9. Siriphap A., Leekitcharoenphon P., Kaas R.S., Theethakaew Ch., Aarestrup F.M., Sutheinkul O., Hendriksen R.S. Characterization and genetic variation of *Vibrio cholerae* isolated from clinical and environmental sources in Thailand. *PLoS ONE*. 2017; 12(1):e169324. DOI: 10.1371/journal.pone.0169324.
10. Wang H., Yang Ch., Sun Z., Zheng W., Yu H., Wu Y., Didelot X., Yang R., Pan J., Cui Y. Genomic epidemiology of *Vibrio cholerae* reveals the regional and global spread of two epidemic non-toxicogenic lineages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008046. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008046.
11. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Титова С.В., Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И. ГИС: возможности анализа данных фено- и генотипирования холерных вибрионов O1 серогруппы Эль Тор, изолированных из

- водных объектов окружающей среды на территории Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 6:19–25. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-6-19-25.
12. Кулешов К.В., Маркелов М.Л., Дедков В.Г., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Керманов А.В., Писанов Р.В., Кругликов В.Д., Мазрух А.Б., Малеев В.В., Шипулин Г.А. Филогенетический анализ геномов штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на территории Ростовской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013; 6:13–20.
13. 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 *ctxAtcpA⁺*, выделенных из водных объектов Российской Федерации, охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014; 9:32–5.
14. 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.
15. Миронова Л.В., Пономарева А.С., Хунхеса Ж.Ю., Гладких А.С., Балахонов С.В. Генетическое разнообразие *Vibrio cholerae* O1 El Tor при эпидемических осложнениях в Сибирском и Дальневосточном регионах. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2019; 37(4):165–72. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-38-47.
16. Mukhopadhyay A.K., Chakraborty S., Takeda Y., Nair G.B., Berg D.E. Characterization of VPI pathogenicity island and CTXphi prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2001; 183(16):4737–46. DOI: 10.1128/JB.183.16.4737-4746.2001.
17. Faruque S.M., Chowdhury N., Kamruzzaman M., Dziejman M., Rahman M.H., Sack D.A., Nair G.B., Mekalanos J.J. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101(7):2123–8. DOI: 10.1073/pnas.0308485100.
18. O’Shea Y.A., Reen F.J., Quirke A.M., Boyd E.F. Evolutionary genetic analysis of the emergence of epidemic *Vibrio cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(10):4657–71. DOI: 10.1128/JCM.42.10.4657-4671.2004.
19. Pang B., Yan M., Cui Z., Ye X., Diao B., Ren Y., Gao S., Zhang L., Kan B. Genetic diversity of toxicogenic and nontoxicogenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization. *J. Bacteriol.* 2007; 189(13):4837–49. DOI: 10.1128/JB.01959-06.
20. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин М.Б., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н. Вариабельные tandemные повторы, выявленные при компьютерном анализе генома *Vibrio cholerae*. *Биотехнология*. 2001; 6:85–8.
21. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. INDEL-тиปирование штаммов *Vibrio cholerae*. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; 22(4):195–200. DOI: 10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200.
22. Baddam R., Sarker N., Ahmed D., Mazumder R., Abdulla A., Morshed R., Hussain A., Begum S., Shahrin L., Khan A.I., Islam M.S., Ahmed T., Alam M., Clemens J.D., Ahmed N. Genome dynamics of *Vibrio cholerae* isolates linked to seasonal outbreaks of cholera in Dhaka, Bangladesh. *mBio*. 2020; 11(1):e03339-19. DOI: 10.1128/mBio.03339-19.
23. 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.
24. Левченко Д.А., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Ежова М.И., Ренгач М.В. Результаты мониторинга холерных вибрионов на территории Республики Калмыкия в 2013–2017 гг. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2019; 9(4):6–11. DOI: 10.18565/epidem.2019.94.6-11.
25. Смирнова Н.И., Агафонова Е.Ю., Щелканова Е.Ю., Агафонов Д.А., Краснов Я.М., Ливанова Л.Ф., Кутырев В.В. Геномное разнообразие нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории России и сопредельных стран. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2018; 36(2):76–86. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84.
26. Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Гольдапель Э.Г., Балахонов С.В. Мультилокусное сиквенс-тиปирование штаммов *Vibrio cholerae* разной эпидемической значимости. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2015; 33(2):26–32.
27. Миронова Л.В., Бочагин Н.О., Гладких А.С., Феранчук С.И., Пономарева А.С., Балахонов С.В. Филогенетическое положение и особенности структуры геномов *ctxABtcpA⁺* *Vibrio cholerae* из поверхностных водоемов на неэндемичной по холере территории. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:115–23. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-115-123.

References

1. 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–E7739. DOI: 10.1073/pnas.1608732113.
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. Mironova L.V. [Current views on objective laws of a cholera epidemic process: ecological and molecular-biological aspects]. *Epidemiologiya i Infectionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2018; 23(5):242–50. DOI: 10.18821/1560-9525-2018-23-5-242-250.
4. Karaolis D.K., Johnson J.A., Bailey C.C., Boedeker E.C., Kaper J.B., Reeves P.R. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998; 95(6):3134–9. DOI: 10.1073/pnas.95.6.3134.
5. Waldor M.K., Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*. 1996; 272(5270):1910–4. DOI: 10.1126/science.272.5270.1910.
6. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nahN*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology (Reading)*. 2002; 148(Pt 11):3681–93. DOI: 10.1099/00221287-148-11-3681.
7. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002; 99(3):1556–61. DOI: 10.1073/pnas.042667999.
8. Smirnova N.I., Kul’shan T.A., Baranikhina E.Yu., Krasnov Ya.M., Agafonov D.A., Kutyrev V.V. [Genome structure and origin of non-toxicogenic *Vibrio cholerae* El Tor strains with different epidemiological significance]. *Geneika [Genetics]*. 2016; 52(9):1029–41. DOI: 10.7868/S0016675816060126.
9. Siriphap A., Leekitcharoenphon P., Kaas R.S., Theethakaew Ch., Aarestrup F.M., Sutheinkul O., Hendriksen R.S. Characterization and genetic variation of *Vibrio cholerae* isolated from clinical and environmental sources in Thailand. *PLoS ONE*. 2017; 12(1):e0169324. DOI: 10.1371/journal.pone.0169324.
10. Wang H., Yang Ch., Sun Z., Zheng W., Yu H., Wu Y., Didelot X., Yang R., Pan J., Cui Y. Genomic epidemiology of *Vibrio cholerae* reveals the regional and global spread of two epidemic non-toxicogenic lineages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008046. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008046.
11. Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Vodop’yanov A.S., Titova S.V., Arkhangel’skaya I.V., Nepomnyashchaya N.B., Ezhova M.I. [GIS: capabilities of data analysis of pheno- and genotyping of El Tor O1 serogroup cholera vibrios isolated from surface water bodies in the Russia Federation]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2016; 6:19–25. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-6-19-25.
12. Kuleshov K.V., Markelov M.L., Dedkov V.G., Vodop’yanov S.O., Vodop’yanov A.S., Kermanov A.V., Pisanov R.V., Kruglikov V.D., Mazrukho A.B., Maleev V.V., Shipulin G.A. [Phylogenetic analysis of genomes of *Vibrio cholerae* strains isolated on the territory of Rostov region]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2013; 6:13–20.
13. Zubkova D.A., Kruglikov V.D., Arkhangel’skaya I.V., Vodop’yanov A.S., Nepomnyashchaya N.B., Vodop’yanov S.O. [Genetic features of strains of *Vibrio cholerae* O1 *ctxAtcpA⁺*, isolated from water bodies of the Russian Federation, described using a new geo-information systems]. *Zdorov’e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2014; 9(258):32–5.
14. Titova S.V., Monakhova E.V. [Potential hazard of non-toxicogenic *Vibrio cholerae* strains containing genes of toxin-coregulated pilus of adhesion]. *Epidemiologiya i Infektionnye Bolezni. Aktualnye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]*. 2016; 5:65–70.
15. Mironova L.V., Ponomareva A.S., Khunkheeva Zh.Yu., Gladkikh A.S., Balakhonov S.V. [Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 El Tor during epidemic complications in the Siberian and Far East regions]. *Molekuljarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2019; 37(4):165–72. DOI: 10.17116/molgen201937041165.
16. Mukhopadhyay A.K., Chakraborty S., Takeda Y., Nair G.B., Berg D.E. Characterization of VPI pathogenicity island and CTXphi prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2001; 183(16):4737–46. DOI: 10.1128/JB.183.16.4737-4746.2001.

17. Faruque S.M., Chowdhury N., Kamruzzaman M., Dziejman M., Rahman M.H., Sack D.A., Nair G.B., Mekalanos J.J. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004; 101(7):2123–8. DOI: 10.1073/pnas.0308485100.
18. O’Shea Y.A., Reen F.J., Quirke A.M., Boyd E.F. Evolutionary genetic analysis of the emergence of epidemic *Vibrio cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(10):4657–71. DOI: 10.1128/JCM.42.10.4657-4671.2004.
19. Pang B., Yan M., Cui Z., Ye X., Diao B., Ren Y., Gao S., Zhang L., Kan B. Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization. *J. Bacteriol.* 2007; 189(13):4837–49. DOI: 10.1128/JB.01959-06.
20. Vodop’yanov A.S., Vodop’yanov S.O., Mishan’kin M.B., Suchkov I.Yu., Mishan’kin B.N. [Variable tandem repeats, revealed in computer analysis of *Vibrio cholerae* genome]. *Biotekhnologiya [Biotechnology]*. 2001; 6:85–8.
21. Vodop’yanov A.S., Vodop’yanov S.O., Oleynikov I.P., Mishan’kin B.N. [INDEL-genotyping of *Vibrio cholerae* strains]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2017; 22(4):195–200. DOI: 10.18821/f560-9529-2017-22-4-195-200.
22. Baddam R., Sarker N., Ahmed D., Mazumder R., Abdullah A., Morshed R., Hussain A., Begum S., Shahrin L., Khan A.I., Islam M.S., Ahmed T., Alam M., Clemens J.D., Ahmed N. Genome dynamics of *Vibrio cholerae* isolates linked to seasonal outbreaks of cholera in Dhaka, Bangladesh. *mBio.* 2020; 11(1):e03339-19. DOI: 10.1128/mBio.03339-19.
23. 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.
24. Levchenko D.A., Arkhangel’skaya I.V., Kruglikov V.D., Gaevskaya N.E., Ezhova M.I., Rengach M.V. [Results of *Vibrio cholerae* monitoring in the Republic of Kalmykia in 2013–2017]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2019; 9(4):6–11. DOI: 10.18565/epidem.2019.94.6–11.
25. Smirnova N.I., Agafonova E.Y., Shchelkanova E.Y., Agafonov D.A., Krasnov Y.M., Livanova L.F., Kutyrev V.V. [Genomic diversity of non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains, isolated in the territory of Russia and neighboring states]. *Molekuljarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics Microbiology and Virology]*. 2018; 3:76–84. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84.
26. Mironova L.V., Afanas’ev M.V., Gol’dapel E.G., Balakhonov S.V. [Multilocus sequence typing of *Vibrio cholerae* strains with different epidemic significance]. *Molekuljarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics Microbiology and Virology]*. 2015; 33(2):26–32.
27. Mironova L.V., Bochalgin N.O., Gladikh A.S., Feranchuk S.I., Ponomareva A.S., Balakhonov S.V. Phylogenetic affinity and genome structure features of ctxAB-tcpA⁺ *Vibrio cholerae* from the surface waterbodies in the territory that is non-endemic as regards cholera. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 1:115–123. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-115-123.

Authors:

Kritsky A.A., Smirnova N.I., Gracheva I.V., Katyshev A.D., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Kalyaeva T.B., Obrotkina N.F. Elista Plague Control Station. Post Box 28, Elista, 358000, Russian Federation. E-mail: pestis-kalmykia@yandex.ru.

Об авторах:

Критский А.А., Смирнова Н.И., Грачева И.В., Катышев А.Д., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Калеяева Т.Б., Оброткина Н.Ф. Элистинская противочумная станция. Российская Федерация, 358000, Элиста, Главпочтамт, а/я 28. E-mail: pestis-kalmykia@yandex.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-83-88

УДК 616.98:579.842.15

**Г.В. Куклина, С.С. Ипатов, Д.В. Печенкин, А.В. Еремкин, А.А. Кытманов, М.Ю. Дубровин,
А.С. Горшков**

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГИБРИДОМ-ПРОДУЦЕНТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ШИГАПОДОБНЫМ ТОКСИНАМ I И II ТИПОВ

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

Цель – получить и охарактеризовать гибридомы-продуценты моноклональных антител к шигаподобным токсинам I и II типов. **Материалы и методы.** В работе использованы препараты шигаподобных токсинов I и II типов, полученные в филиале ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров); мыши линии BALB/c; клетки миеломы SP2/0-Ag14. Гибридизацию спленоцитов иммунных мышей и миеломных клеток проводили по методике G. Kohler и C. Milstein в модификации De St. Fazekas и D. Scheidegger с использованием 50 % полиэтилен-гликоля. Гибридные клеточные линии, продуцирующие специфические моноклональные антитела, клонировали методом лимитирующих разведений. Изучение ростовых и секреторных свойств гибридом проводили при культивировании *in vitro* и *in vivo*. Специфическую активность иммунных сывороток, культуральных и асцитических жидкостей гибридом исследовали методом непрямого иммуноферментного анализа. Моноклональные антитела из асцитических жидкостей выделяли осаждением сульфатом аммония с последующей очисткой ионообменной хроматографией. **Результаты и обсуждение.** Получена панель из 8 гибридом-продуцентов моноклональных антител к шигаподобным токсинам I и II типов. Гибридомы характеризуются стабильностью пролиферативной и антителопродуцирующей активности на протяжении десяти пассажей *in vitro* и трех пассажей *in vivo* (срок наблюдения). Полученные моноклональные антитела могут быть использованы для детекции иммуноферментным методом шигаподобных токсинов I и II типов. При этом минимальная выявляемая концентрация искомых анализов в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа составила 1 нг/мл. Показана возможность выявления шигаподобных токсинов без типовой дифференциации при использовании в иммуноферментном анализе полирецепторной смеси моноклональных антител для сенсибилизации планшета и полиспецифичной смеси иммuno-пероксидазных конъюгатов.

Ключевые слова: шигаподобные токсины, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ.

Корреспондирующий автор: Печенкин Денис Валерьевич, e-mail: 23527@mil.ru.

Для цитирования: Куклина Г.В., Ипатов С.С., Печенкин Д.В., Еремкин А.В., Кытманов А.А., Дубровин М.Ю., Горшков А.С. Получение и характеристика гибридом-продуцентов моноклональных антител к шигаподобным токсинам I и II типов. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; 3:83–88. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-83-88.

Поступила 23.09.2020. Отправлена на доработку 20.10.2020. Принята к публ. 30.10.2020.

**G.V. Kuklina, S.S. Ipatov, D.V. Pechenkin, A.V. Eremkin, A.A. Kytmanov, M.Yu. Dubrovin,
A.S. Gorshkov**

Obtaining and Characterization of Hybridomas Producing Monoclonal Antibodies to Shiga-Like Toxins of I and II Types

Affiliated Branch of the Federal State Budgetary Institution “48th Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation

Abstract. Objective – obtaining and characterization of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against I and II types of shiga-like toxins. **Materials and methods.** Shiga-like toxins obtained in “48th Central Research Institute” of Ministry of Defense of Russian Federation (Kirov), BALB/c mice, myeloma cells SP2/0-Ag14 were used in research. Immune splenocytes and SP2/0-Ag14 myeloma cells were fused according to G. Kohler and C. Milstein method in De St. Fazekas and D. Scheidegger modification using 50 % polyethylene glycol. Hybrid cell lines producing specific monoclonal antibodies were cloned by limited dilutions. Hybridomas growth and producing properties were studied in vitro and in vivo. Specific activity of immune sera, culture and ascitic fluids were studied by indirect ELISA. Monoclonal antibodies from ascitic fluids were precipitated by saturated ammonium sulfate, followed by ion exchange chromatography. **Results and discussion.** 8 hybridomas producing monoclonal antibodies against I and II types shiga-like toxins were obtained. Hybridomas are characterized by stable proliferation and antibody-producing activity during 10 passages in vitro and 3 passages in vivo (observation period). Obtained monoclonal antibodies can be used for ELISA detection of I and II types shiga-like toxins. Minimum detectable concentration of shiga-like toxins in sandwich ELISA is 1 ng/ml. The possibility of detecting shiga-like toxins without typical differentiation was shown when using in the enzyme immunoassay a polyreceptor mixture of monoclonal antibodies for sensitizing the plate and a polyspecific mixture of immunoperoxidase conjugates.

Key words: shiga-like toxins, monoclonal antibodies, and enzyme linked immunosorbent assay.

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

Corresponding author: Denis V. Pechenkin, e-mail: 23527@mil.ru.

Citation: Kuklina G.V., Ipatov S.S., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kytmanov A.A., Dubrovin M.Yu., Gorschkov A.S. Obtaining and Characterization of Hybridomas Producing Monoclonal Antibodies to Shiga-Like Toxins of I and II Types. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:83–88. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-83-88.

Received 23.09.2020. Revised 20.10.2020. Accepted 30.10.2020.

Kuklina G.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5429-6295>
 Ipatov S.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2881-4730>
 Pechenkin D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8277-3573>
 Eremkin A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3133-1921>

Kytmanov A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0277-2226>
 Dubrovin M.Y., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9171-1603>
 Gorshkov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5164-3645>

Одной из наиболее значимых групп бактериальных токсинов является семейство шигаподобных токсинов (Stx), которое включает шигеллезный токсин, продуцируемый *Shigella dysenteriae*, а также шигаподобные токсины I и II типов (Stx1 и Stx2). Основными природными продуцентами Stx1 и Stx2 являются шигатоксинпродуцирующие штаммы *Escherichia coli* (STEC) [1].

Представители семейства Stx имеют сходную молекулярную структуру, для которой характерно наличие одной субъединицы А (~32 кДа) и пяти субъединиц В (~7,7 кДа каждая). В субъединице А выделяют также связанные между собой дисульфидной связью фрагменты A1 и A2, которые разделяются после проникновения в клетку-мишень, после чего фрагмент A1 блокирует синтез белка в клетке [2].

Клинически для инфекционного процесса, вызванного STEC, характерно развитие диареи с явлениями геморрагического колита [3, 4]. Примерно в 5 % случаев колиту сопутствует системный гемолиз, что приводит к развитию гемолитико-уре米ческого синдрома. Особенно высокий уровень летальности при этом наблюдается у новорожденных детей [5]. Отмечено, что наиболее часто гемолитико-уре米ческий синдром ассоциирован с продукцией шигаподобного токсина второго типа – Stx2, что обуславливает актуальность разработки средств лабораторной диагностики Stx2 и шигаподобных токсинов в целом [6].

Вспышки заболеваний, вызываемых STEC, происходят регулярно. Как правило, частой причиной вспышек является кишечная палочка серотипа O157. В то же время наиболее известной является вспышка 2011 г. в Европе, вызванная кишечной палочкой серотипа O104:H4. По данным Всемирной организации здравоохранения, в результате этой вспышки погибло 53 человека [7, 8].

На современном этапе развития средств диагностики шигаподобных токсинов значительное место занимают иммунохимические средства. Они представлены как на зарубежном, так и на отечественном рынке. Фирма R-Biopharm AG (Германия) производит и реализует наборы мультиплексного иммунохроматографического анализа для одновременного выявления Stx1, Stx2 и специфического антигена O157 – RIDA®QUICK Verotoxin/O157 Combi. Этот же производитель предлагает набор RIDASCREEN® Verotoxin для иммуноферментного полуколичественного выявления шигаподобных токсинов.

Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации разработаны и утвержде-

ны к применению методические указания по лабораторной диагностике заболеваний, вызываемых *E. coli*, продуцирующих шигаподобные токсины – инфекции в пищевых продуктах, – МУК 4.2.2963-11. Данные МУК предусматривают использование диагностических наборов для латекс-агглютинации производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Россия) и иммунохроматографических наборов DUOPATH®Verotoxins (Merck Millipore, США).

Таким образом, наиболее востребованными средствами диагностики шигаподобных токсинов на сегодняшний день являются иммунохимические наборы реагентов. Для создания современных средств иммунодиагностики оптимальным вариантом является использование моноклональных антител (МКАТ). Главным источником МКАТ по-прежнему остаются гибридные клеточные линии.

В рамках настоящей работы проведен комплекс исследований по получению гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к шигаподобным токсинам I и II типов, и исследование возможности использования МКАТ в иммунохимических тестах, предназначенных для выявления Stx1 и Stx2.

Материалы и методы

В работе использованы препараты шигаподобных токсинов, полученные из культуральных жидкостей культур *E. coli* следующих штаммов: рекомбинантный – продуцент Stx1; RKI № 112027 (серотип O104:H4) – продуцент Stx2. Специфическую активность препаратов шигаподобных токсинов контролировали в иммуноферментном teste RIDASCREEN®Verotoxin (R-Biopharm AG, Германия) и в иммунохроматографическом экспресс-тесте DUOPATH®Verotoxin (Merck Millipore, США). Концентрацию белка во всех случаях определяли по методу Лоури [9].

Гибридизацию спленоцитов иммунизированных животных с клетками миеломы Sp2/0-Ag14 проводили на четвертые сутки после заключительной иммунизации с использованием 50 % раствора полиэтиленгликоля ПЭГ 1450 (Sigma-Aldrich, США) [10, 11].

Исследование специфической активности гипериммунных сывороток, культуральных и асцитических жидкостей проводили методом непрямого ИФА [12]. Планшеты NUNC™ (Thermo Scientific, Дания) для постановки ИФА сенсибилизовали шигаподобными токсинами в концентрации 10 мкг/мл. Сыворотки для исследования готовили путем последовательных двукратных разведений

от 1:1000 до 1:512000, культуральные жидкости – от 1:50 до 1:6400, асцитические жидкости – от 1:10000 до 1:10240000. Антивидовой иммунопероксидазный конъюгат против иммуноглобулинов мыши (Sigma-Aldrich, США) применяли в рабочем разведении. Для выявления продуктов реакции использовали субстратно-индикаторную смесь на основе ортофенилендиамина (Sigma-Aldrich, США). Результаты реакции учитывали путем определения оптической плотности субстратно-индикаторной смеси на планшетном фотометре.

Для получения асцитических жидкостей мышам линии BALB/c интраперитонеально вводили по 0,5 мл минерального масла Pristane (Sigma-Aldrich, США), а через 14 суток – 2 млн гибридных клеток.

Иммуноглобулины из асцитических жидкостей выделяли осаждением насыщенным раствором сульфата аммония с последующей очисткой ионообменной хроматографией на DEAE Toyopearl (Tosoh Bioscience, США).

Синтез иммунопероксидазных конъюгатов (ИПК) осуществляли методом периодатного окисления [13].

Для определения минимальных выявляемых концентраций (чувствительности ИФА) использовали последовательные двукратные разведения препаратов шигаподобных токсинов от 128 до 1 нг/мл. Для выполнения сэндвич-варианта ИФА иммунологические планшеты сенсибилизировали различными МКАТ в концентрации 20 мкг/мл. Для сенсибилизации планшета также использовали коммерческие МКАТ к В-субъединицам Stx1 и Stx2 (MyBioSource, США, кат. № MBS146695, MBS146696). На следующем этапе в планшеты вносили приготовленные разведения шигаподобных токсинов, а затем синтезированные ИПК в рабочем разведении. Далее постановку ИФА осуществляли, как описано выше.

Работы с лабораторными животными проводились в соответствии с международными этическими нормами, законодательством Российской Федерации и нормативными документами учреждения.

Результаты и обсуждение

С целью получения гибридом-продуцентов моноклональных антител к шигаподобным токсинам I и II типов иммунизацию мышей линии BALB/c проводили путем подкожного введения возрастающих доз препаратов анатоксинов (Stx1, Stx2). Иммунизация линейных мышей шигаподобными анатоксинами обеспечила титры специфических антител в крови опытных животных на уровне 1:64000 и 1:128000. Животных с максимальным уровнем сероконверсии использовали в качестве источника иммунных спленоцитов в опытах по гибридизации.

Всего проведено по два эксперимента по гибридизации для каждого типа токсина. В результате опытов по слиянию иммунных спленоцитов и миеломных клеток получены 15 популяций гибридных

клеток, продуцирующих антитела к шигаподобному токсину I типа, и 18 популяций – к шигаподобному токсину II типа. С целью отбора наиболее перспективных для клонирования растущих гибридных клеток оценивали их морфологию, пролиферативную активность, а также способность сохранять высокий уровень синтеза специфических антител. По результатам ИФА наиболее выраженный уровень продукции МКАТ к Stx1 в титрах от 1:400 до 1:1600 отмечен у гибридных клеточных линий 368D5, 383D5, 383F4, 384A10, а к Stx2 – у 361D6, 363B3, 365E11, 366E6. Клонирование культур гибридных клеток проводили методом лимитирующих разведений из расчета одна клетка на лунку. Клонирование повторяли не менее двух раз, отбирая на каждой стадии клоны с наибольшей пролиферативной активностью и устойчивым синтезом специфических антител. В результате клонирований от 95 до 100 % клеток в популяциях стабильно продуцировали антитела к шигаподобным токсинам.

Таким образом, в результате проведенных гибридизаций и последующих клонирований получены гибридомы-продуценты моноклональных антител к шигаподобным токсинам I и II типов. Гибридные клетки размножали путем пассирования в культуральных планшетах и культуральных флаконах возрастающего объема. При этом минимальная посевная концентрация клеток составила 100 и 200 тыс. в 1 мл, а антителопродуцирующая активность на протяжении десяти пассажей *in vitro* сохранялась на уровне титров антител в ИФА от 1:400 до 1:1600 (табл. 1). Пролиферирующие *in vitro* гибридные клетки вводили внутрибрюшинно мышам линии BALB/c. В результате получены асцитические жидкости, характеризующиеся титрами специфических антител в ИФА от 1:640000 до 1:5120000. Следует отметить, что на протяжении трех пассажей *in vivo* (количество проведенных нами исследований) гибридные клетки стабильно синтезировали антитела.

В серии экспериментов по определению чувствительности сэндвич-варианта ИФА при выявлении шигаподобных токсинов I и II типов использованы все возможные сочетания МКАТ для сенсибилизации планшета и в составе ИПК. Как видно из данных табл. 2, результат ИФА отрицателен при одновременном использовании МКАТ, продуцируемых гибридомой 383F4, в сенситине и конъюгате. Остальные сочетания МКАТ к шигаподобному токсину I типа позволяют выявлять методом ИФА Stx1 в концентрациях от 1 до 32 нг/мл. При этом наибольшую чувствительность анализа обеспечивают пары МКАТ «сенситин – конъюгат»: 383F4–384A10, 384A10–383F4, 384A10–384A10. При использовании в качестве антител захвата коммерческих МКАТ к В-субъединице шигаподобного токсина I типа (MyBioSource, США) получены результаты чувствительности ИФА того же порядка.

Результаты исследования чувствительности сэндвич-варианта ИФА при выявлении шигапо-

Таблица 1 / Table 1

Характеристики гибридом-продуцентов моноклональных антител к шигаподобным токсинам I и II типов**Features of hybridomas producing monoclonal antibodies to shiga-like toxins of I and II types**

Наименование гибридомы-продуцента МКАТ Hybridoma-producer of monoclonal antibodies (MCAb)	Специфичность МКАТ MCAb specificity	Минимальная посевная концентрация, тыс. клеток в 1 мл Minimum inoculum concentration, thous. of cells per 1 ml	Титр МКАТ в культуральной жидкости MCAb titer in culture liquid	Титр МКАТ в асцитической жидкости MCAb titer in ascitic liquid
368D5	Stx1	100	1:1600	1:5120000
383D5		200	1:400	1:1280000
383F4		200	1:400	1:1280000
384A10		200	1:800	1:1280000
361D6	Stx2	200	1:800	1:2560000
363B3		100	1:1600	1:5120000
365E11		200	1:800	1:2560000
366E6		200	1:400	1:640000

Таблица 2 / Table 2

Чувствительность иммуноферментного анализа при выявлении шигаподобного токсина I типа**Sensitivity of ELISA when detecting shiga-like toxin of type I**

Антитела, используемые для сенсибилизации планшета Antibodies used for plate sensitization	Минимальная выявляемая концентрация шигаподобного токсина I типа в ИФА при использовании ИПК на основе антител, нг/мл (n=7) Minimum detected concentration of shiga-like toxin (type I) in ELISA using antibody-based immunoperoxidase conjugates, ng/ml (n=7)			
	MKAT368D5 MCAb 368D5	MKAT383D5 MCAb 383D5	MKAT383F4 MCAb 383F4	MKAT384A10 MCAb384A10
MKAT 368D5 MCAb 368D5	32	8	2	4
MKAT 383D5 MCAb 383D5	16	16	2	2
MKAT 383F4 MCAb 383F4	2	2	–	1
MKAT 384A10 MCAb 384A10	2	2	1	1
1B	8	8	4	8

Примечание: в таблице приведены медианы минимальных выявляемых концентраций; «–» – результат ИФА отрицательный; 1B – МКАТ MyBioSource (США) к В-субъединице шигаподобного токсина I типа.

Note: the table shows the medians of the minimum detectable concentrations; “–” – the ELISA result is negative; 1B – MCAb MyBioSource (USA) to the B-subunit of type I shiga-like toxin.

доброго токсина II типа представлены в табл. 3. Использование различных сочетаний МКАТ в сенситине и составе ИПК, в том числе использование для сенсибилизации планшета антител к В-субъединице шигаподобного токсина II типа (MyBioSource, США), обеспечивает выявление в ИФА Stx2 в концентрациях от 1 до 16 нг/мл. При этом максимальная чувствительность проведенного анализа получена с использованием МКАТ 365E11 как в сенситине, так и в составе ИПК.

На заключительном этапе исследований представлялось необходимым оценить возможность использования МКАТ, производимых полученными гибридными клеточными линиями, для выявления шигаподобных токсинов обоих типов (без дифференциации) при выполнении одной постановки им-

муноферментного анализа. Для этого иммунологический планшет сенсибилизовали равновесной по концентрации белка смесью МКАТ 384A10 (к Stx1) и МКАТ 365E11 (к Stx2). Процедуру сэндвич-варианта анализа выполняли так, как описано выше, в качестве анализаторов использовали различные разведения шигаподобных токсинов обоих типов. Для выявления связавшихся токсинов применяли равнообъемную смесь иммунопероксидазных конъюгатов, взятых в разведениях, в два раза превышающих рабочие. В постановке ИФА использованы ИПК на основе МКАТ 383F4 (к Stx1) и на основе МКАТ 365E11 (к Stx2). Результаты данного эксперимента подтвердили возможность одновременного выявления шигаподобных токсинов I и II типов в концентрациях 1 нг/мл и выше в одной постановке ИФА.

Таблица 3 / Table 3

Чувствительность иммуноферментного анализа при выявлении шигаподобного токсина II типа

Sensitivity of ELISA when detecting shiga-like-toxin of type II

Антитела, используемые для сенсибилизации планшета Antibodies used for plate sensitization	Минимальная выявляемая концентрация шигаподобного токсина II типа в ИФА при использовании ИПК на основе антител, нг/мл (n=7) Minimum detected concentration of shiga-like toxin (type II) in ELISA using antibody-based immunoperoxidase conjugates, ng/ml (n=7)			
	MKAT361D6 MCAb 361D6	MKAT363B3 MCAb 363B3	MKAT365E11 MCAb 365E11	MKAT366E6 MCAb366E6
MKAT 361D6 MCAb 361D6	4	4	4	8
MKAT 363B3 MCAb 363B3	4	16	4	8
MKAT 365E11 MCAb 365E11	4	2	1	4
MKAT 366E6 MCAb366E6	4	4	2	4
2B	2	8	4	4

Примечание: в таблице приведены медианы минимальных выявляемых концентраций; 2B – MKAT MyBioSource (США) к В-субъединице шигаподобного токсина II типа.

Note: the table shows the medians of the minimum detectable concentrations; 2B – MCAb MyBioSource (USA) to the B-subunit of type II shiga-like toxin.

В результате проведенных исследований получены по четыре гибридомы, продуцирующие моно克лональные антитела к шигаподобным токсинам I и II типов и сохраняющие стабильность основных свойств на протяжении десяти пассажей *in vitro* и трех пассажей *in vivo*. Получены моноклональные антитела, позволяющие в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа выявлять шигаподобные токсины I и II типов в концентрации 1 нг/мл и более.

Показана возможность выявления шигаподобных токсинов без типовой дифференциации при использовании в ИФА полирецепторной смеси MKAT для сенсибилизации планшета и полиспецифичной смеси иммунопероксидазных конъюгатов.

Гибридомы-продуценты и моноклональные антитела планируется использовать для изготовления иммунохимических наборов реагентов для выявления шигаподобных токсинов I и II типов.

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

Список литературы

- Melton-Celsa A.R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol. Spectr.* 2014; 2(4):EHEC-0024-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.
- Szewczak A.A., Moore P.B., Chang Y.L., Wool I.G. The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1993; 90(20):9581–5. DOI: 0.1073/pnas.90.20.9581.
- Gyles C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 2007; 85(13):E45–E62. DOI: 10.2527/jas.2006-508.
- Paletta A.C.C., Castro V.S., Conte-Junior C.A. Shiga toxin-producing and enteroaggregative *Escherichia coli* in animal, foods and humans: pathogenicity mechanisms, detection methods, and epidemiology. *Curr. Microbiol.* 2020; 77(4):612–20. DOI: 10.1007/s00284-019-01842-1.
- Taylor C.M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1-induced haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2008; 23(9):1425–31. DOI: 10.1007/s00467-008-0820-3.

6. Joseph A., Cointe A., Kurkdjian P.M., Rafat C., Hertig A. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: a narrative review. *Toxins (Basel).* 2020; 12(2):67. DOI: 10.3390/toxins2020067.

7. *E. coli*: Rapid Responce in a crisis. European Food Safety Authority. [Электронный ресурс]. URL: www.efsa.europa.eu/en/press/news/120711 (дата обращения 10.07.2020).

8. Онищенко Г.Г., Дятлов И.А., Светоч Э.А., Воложанцев Н.В., Баннов В.А., Карпев Н.Н., Борзенков В.Н., Фурсова Н.К., Шемякин И.Г., Богун А.Г., Кисличкина А.А., Попова А.В., Мякинина В.П., Теймуразов М.Г., Полосенко О.В., Кафтырева Л.А., Макарова М.А., Матвеева З.Н., Гречанинова Т.А., Григорьева Н.С., Кича Е.В., Забалуева Г.В., Кутасова Т.Б., Коржаев Ю.Н., Башкетова Н.С., Бушманова О.Н., Сталевская А.В., Чхинджерия И.Г., Жебрун А.Б. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсинпродуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году. *Вестник РАМН.* 2015; 1:70–81. DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1234.

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

10. De StGroth S.F., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods.* 1980; 35(1-2):1–21. DOI: 10.1016/0022-1759(80)90146-5.

11. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256(5517):495–7. DOI: 10.1038/256495a0.

12. Кэтти Д., редактор. Антитела. Методы: Кн. 2: пер. с англ. М.: Мир, 1991. 384 с.

13. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugated. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12): 1084–91. DOI: 10.1177/22.12.1084.

References

- Melton-Celsa A.R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol. Spectr.* 2014; 2(4):EHEC-0024-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.
- Szewczak A.A., Moore P.B., Chang Y.L., Wool I.G. The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1993; 90(20):9581–5. DOI: 0.1073/pnas.90.20.9581.
- Gyles C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 2007; 85(13):E45–E62. DOI: 10.2527/jas.2006-508.
- Paletta A.C.C., Castro V.S., Conte-Junior C.A. Shiga toxin-producing and enteroaggregative *Escherichia coli* in animal, foods and humans: pathogenicity mechanisms, detection methods, and epidemiology. *Curr. Microbiol.* 2020; 77(4):612–20. DOI: 10.1007/s00284-019-01842-1.
- Taylor C.M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1-induced haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2008; 23(9):1425–31. DOI: 10.1007/s00467-008-0820-3.

- Pediatr. Nephrol.* 2008; 23(9):1425–31. DOI: 10.1007/s00467-008-0820-3.
6. Joseph A., Cointe A., Kurkdjian P.M., Rafat C., Hertig A. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: a narrative review. *Toxins (Basel)*. 2020; 12(2):67. DOI: 10.3390/toxins12020067.
 7. *E. coli*: Rapid Response in a crisis. European Food Safety Authority. (Cited 10 Jul 2020). [Internet]. Available from: www.efsa.europa.eu/en/press/news/120711.
 8. Onishenko G., Dyatlov I., Svetoch N., Volozhantsev N.V., Bannov V.A., Kartsev N.N., Borzenkov V.N., Fursova N.K., Shemyakin I.G., Bogun A.G., Kislichkina A.A., Popova A.V., Myakinina V.P., Teimurazov M.G., Polosenko O.V., Kaftyreva L.A., Makarova M.A., Matveeva Z.N., Grechaninova T.A., Grigor'eva N.S., Kicha E.V., Zabalueva G.V., Kutusova T.B., Korzhaev Yu.N., Bashketova N.S., Bushmanova O.N., Stalevskaya A.V., Chkhinzheria I.G., Zhebrun A.B. [Molecular genetic characteristics of shiga-toxins released during a food outbreak in St. Petersburg in 2013]. *Vestnik Rossiiskoj Akademii Meditsinskikh Nauk [Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences]*. 2015; 1:70–81. DOI: 10.15690/vramn.v7o11.1234.
 9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.
 10. De StGroth S.F., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods*. 1980; 35(1-2):1–21. DOI: 10.1016/0022-1759(80)90146-5.
 11. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256(5517):495–7. DOI: 10.1038/256495a0.
 12. Ketty D, editor. [Antibodies. Methods: Book 2. Translated from English]. Moscow: "Mir"; 1991. Vol. 2. 384 p.
 13. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugated. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12): 1084–91. DOI: 10.1177/22.12.1084.

Authors:

Kuklina G.V., Ipatov S.S., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kytmanov A.A., Dubrovin M.Yu., Gorshkov A.S. Affiliated Branch of the Federal State Budgetary Institution "48th Central Research Institute" of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Kirov, Russian Federation. E-mail: 23527@mil.ru.

Об авторах:

Куклина Г.В., Ипатов С.С., Печенкин Д.В., Еремкин А.В., Кытманов А.А., Дубровин М.Ю., Горшков А.С. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, Киров. E-mail: 23527@mil.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-89-97

УДК 616.932

Л.В. Миронова, А.С. Пономарева, Е.А. Басов, И.С. Федотова, Ж.Ю. Хунхеева, А.В. Фортунатова, Н.О. Бочалгин, А.С. Гладких, Л.Я. Урбанович, С.В. Балахонов

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕТЕКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ *VIBRIO CHOLERAE* В СИСТЕМЕ МОНИТОРИНГА ВИБРИОФЛОРЫ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ

*ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск,
Российская Федерация*

Цель – оценка эффективности применения ПЦР-скрининга генетических детерминант *Vibrio cholerae* в пробах из поверхностных водоемов для оптимизации системы микробиологического мониторинга холеры. **Материалы и методы.** Исследование проводилось в рамках мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов Иркутска. Дизайн исследования предусматривал: 1) ПЦР-скрининг генетических детерминант *V. cholerae* в обогащенных на питательных средах (1 % пептонная вода) пробах из поверхностных водоемов в период мониторинга (824 пробы); 2) изучение динамики накопления ДНК *V. cholerae* при исследовании в ПЦР проб из поверхностных водоемов в процессе культивирования на средах обогащения (16 проб в динамике); 3) экспериментальное исследование детектируемых концентраций холерного вибриона в пробах из поверхностных водоемов. Проводилась индикация видоспецифических (*hlyA*, *toxR*) и серогруппоспецифических (*wbeT*, *wbfR*) детерминант *V. cholerae* в ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной и электрофоретической детекцией. **Результаты и обсуждение.** На первом этапе установлено, что удельный вес положительных по результатам ПЦР-скрининга проб (33,9 %) превысил процент положительных проб при бактериологическом исследовании (19,3 %) ($t=6,6$; $p<0,01$). При оценке динамики накопления ДНК зарегистрировано снижение порогового цикла (C_t) в 1,2–5,2 раза, свидетельствующее о нарастании концентрации холерного вибриона и доказывающее выявление при ПЦР-скрининге генетических детерминант жизнеспособных форм микроорганизма. Расширенное исследование ПЦР-положительных бактериологически отрицательных проб позволило дополнительно выделить четыре культуры *V. cholerae*. Однако в эксперименте с искусственно контаминированными холерным вибрионом образцами воды, в отличие от анализа обогащенных нативных проб, не выявлено различий чувствительности ПЦР-скрининга и бактериологического анализа, что может быть обусловлено особенностями метаболизма и адаптации микроорганизма в разных условиях среды. Результаты комплексного исследования свидетельствуют об эпидемиологической эффективности ПЦР-скрининга, что дает основание рекомендовать его применение в лабораториях федерального, регионального и территориального уровней при мониторинговых исследованиях вибриофлоры проб из объектов окружающей среды после их предварительного обогащения на жидких питательных средах.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, эпидемиологический надзор, мониторинг, поверхностные водоемы, молекулярно-генетический анализ, ПЦР-скрининг.

Корреспондирующий автор: Миронова Лилия Валерьевна, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Для цитирования: Миронова Л.В., Пономарева А.С., Басов Е.А., Федотова И.С., Хунхеева Ж.Ю., Фортунатова А.В., Бочалгин Н.О., Гладких А.С., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В. Оценка эффективности детекции генетических детерминант *Vibrio cholerae* в системе мониторинга вибриофлоры водных объектов. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 3:89–97. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-89-97.

Поступила 04.09.2020. Принята к публ. 09.11.2020.

L.V. Mironova, A.S. Ponomareva, E.A. Basov, I.S. Fedotova, Zh.Yu. Khunkheeva, A.V. Fortunatova, N.O. Bochalgin, A.S. Gladkikh, L.Ya. Urbanovich, S.V. Balakhonov

Assessing the Efficiency of Detection of *Vibrio cholerae* Genetic Determinants Through Waterbody Vibrioflora Monitoring System

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to assess the effectiveness of PCR screening of *Vibrio cholerae* genetic determinants in samples from surface water reservoirs for optimization of the cholera microbiological monitoring system. **Materials and methods.** The study was carried out as a part of the vibrioflora monitoring in surface water bodies in Irkutsk city. The study design included: 1) PCR screening of *V. cholerae* genetic determinants in nutrient-enriched (1 % peptone water) samples from surface water reservoirs during the monitoring period (824 samples); 2) studying of the *V. cholerae* DNA accumulation dynamics applying PCR assay of the samples from surface water reservoirs during cultivation on the enriched media (16 samples in dynamics); 3) experimental study of the detected *V. cholerae* concentrations in samples from surface water reservoirs. Species-specific (*hlyA*, *toxR*) and serogroup-specific (*wbeT*, *wbfR*) *V. cholerae* determinants were indicated in PCR with hybridization-fluorescent and electrophoretic detection. **Results and discussion.** At the first stage it was found that the proportion of the positive samples through PCR screening (33.9 %) exceeded the percentage of the positive samples in bacteriological examination (19.3 %) ($t=6.6$; $p<0,01$). In the assessment of DNA accumulation dynamics, a decrease in the threshold cycle (C_t) by 1.2–5.2 times was recorded, indicating an increase in the *V. cholerae* concentration and proving the detection of genetic determinants of viable forms during PCR screening. An extended study of PCR-positive but bacteriologically negative samples made it possible to additionally isolate 4 *V. cholerae* cultures. However, there were no differences in the sensitivity of PCR screening and bacteriological analysis in the experiment with water samples artificially contaminated with *V. cholerae* unlike the analysis of the enriched native

samples. It can be determined by the metabolism and adaptation peculiarities of the microorganism in different environmental conditions. The results of the integrated study indicate the epidemiological effectiveness of PCR screening which gives grounds to recommend its application in monitoring studies of vibrioflora from environment after preliminary enrichment on liquid nutrient media in the work of federal, territorial, and regional laboratories.

Key words: *Vibrio cholerae*, epidemiological surveillance, monitoring, surface water bodies, molecular-genetic analysis, PCR screening.

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

Corresponding author: Liliya V. Mironova, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Mironova L.V., Ponomareva A.S., Basov E.A., Fedotova I.S., Khunkheeva Zh.Yu., Fortunatova A.V., Bochalgin N.O., Gladkikh A.S., Urbanovich L.Ya., Balakhonov S.V. Assessing the Efficiency of Detection of *Vibrio cholerae* Genetic Determinants Through Waterbody Vibrioflora Monitoring System. *Проблемы Особо Опасных Инфекций [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3: 89–97. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-89-97.

Received 04.09.2020. Accepted 09.11.2020.

Mironova L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8481-6442>
 Ponomareva A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0674-6159>
 Basov E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8358-2880>
 Fedotova I.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9890-0960>
 Khunkheeva Zh.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5388-430>

Fortunatova A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1167-7864>
 Bochalgin N.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3053-6514>
 Gladkikh A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6759-1907>
 Balakhonov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Концепция эпидемиологического надзора за холерой на территории Российской Федерации в качестве одной из основных задач микробиологического мониторинга предусматривает своевременное обнаружение возбудителя в клиническом материале при обследовании контингентов риска или в объектах окружающей среды. Актуальность мониторинга вибриофлоры объектов окружающей среды определяется известной способностью холерного вибриона сохраняться и накапливаться в поверхностных водоемах, обусловливая потенциальный риск развития вспышек водного характера при заносе эпидемически опасного варианта *Vibrio cholerae* O1 или O139, что неоднократно подтверждено при расследовании эпидосложнений по холере в РФ на современном этапе седьмой пандемии [1–3]. Кроме того, есть данные о роли в инфекционной патологии человека нетоксигенных *V. cholerae* как O1 серогруппы, так и неO1/O139 серогрупп [4–8], обнаруживаемых в поверхностных водоемах [9].

Действующими нормативно-методическими документами по лабораторной диагностике холеры при мониторинге объектов окружающей среды предусмотрено проведение только бактериологического анализа по стандартной схеме. Однако на современном этапе развития технологий очевидна необходимость оптимизации и повышения эффективности мониторинговых исследований с интеграцией молекулярно-генетических подходов к индикации возбудителя [10–12]. Значимая роль в этом плане отводится быстрым диагностическим тестам, позволяющим получить оперативную информацию о присутствии возбудителя в пробе [13]. Высокая чувствительность, специфичность, скорость и простота выполнения, доступность ПЦР определили ее широкое внедрение в клиническую лабораторную диагностику инфекционных болезней и в систему мониторинга патогенов в объектах окружающей среды. Эффективность применения ПЦР обусловлена в том числе возможностью детекции низких концентраций возбудителя в исследуемом материале и индикации некультивируемых форм микрорганизмов.

Цель – оценка эффективности применения ПЦР-скрининга генетических детерминант *V. cholerae* в пробах из поверхностных водоемов для оптимизации системы микробиологического мониторинга холеры.

Материалы и методы

Исследование проводилось в рамках многолетнего мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов Иркутска. Дизайн исследования предусматривал три этапа:

- первый – ПЦР-скрининг генетических детерминант холерного вибриона в обогащенных на питательных средах (1 % пептонная вода: первая – 1 пв и вторая – 2 пв) пробах из поверхностных водоемов в течение семи лет в период ежегодного мониторинга (июль–август);

- второй – изучение динамики накопления ДНК *V. cholerae* при исследовании в ПЦР проб из поверхностных водоемов в процессе культивирования на средах обогащения;

- третий – экспериментальное определение детектируемых в ПЦР и при бактериологическом анализе концентраций холерного вибриона в пробах из поверхностных водоемов.

На первом этапе исследования бактериологический анализ проб воды и ила проводился в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». Пробы на 1 пв инкубировались в течение 18 ч с добавлением теллурита калия, на 2 пв – 6 ч без добавления ингибиторов сопутствующей микрофлоры. По окончании указанного времени инкубации объединенные пробы со сред обогащения из каждой стационарной точки исследовались в ПЦР. При подготовке объединенной пробы одной стационарной точки отбирали по 500 мкл с 1 и 2 пв из пробы воды и по 250 мкл с 1 и 2 пв из пробы ила, общий объем пробы – 1500 мкл. Всего за семилетний период проведен анализ 824 объединенных проб.

На втором этапе исследованию в ПЦР подвергались пробы из поверхностных водоемов в процессе обогащения на питательных средах в динамике –

отдельно 1 пв и 2 пв в указанные выше регламентированные нормативно-методическими документами сроки, а также 2 пв с пролонгированной инкубацией (9 ч и 24 ч) и третья пептонная вода (3 пв). Объем пробы с каждой среды обогащения – 1500 мкл.

Экспериментальная оценка чувствительности бактериологического метода и молекулярно-генетического скрининга **на третьем этапе** исследования проводилась с искусственно контаминированными штаммом холерного вибриона (*V. cholerae* O1 El Tor 1-17, генотип *wbeT⁺ hlyA⁺ tcpA⁻ ctxA⁻*) пробами воды, отобранными в одной из стационарных точек поверхностного водоема Иркутска в летний период. С этой целью во флаконы с водой, основным пептоном и теллуритом калия вносились взвеси культуры *V. cholerae* O1 El Tor 1-17 до конечной концентрации 100 мк/мл, 10 мк/мл, 1 мк/мл, 1 мк/10 мл, 1 мк/25 мл, 1 мк/50 мл, 1 мк/100 мл, 1 мк/150 мл, 1 мк/300 мл. Бактериологический анализ проводился в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры», в ПЦР исследовались 1 пв и 2 пв в объеме 1500 мкл каждой среды обогащения.

Подготовка препаратов ДНК. Пробы со сред обогащения центрифугировались при 12000 об/мин 10 мин с последующим ресуспендированием осадка в 100 мкл 0,85 % NaCl. Подготовленные таким образом пробы использовались для экстракции ДНК с применением набора «РИБО-преп».

Постановка ПЦР. Детекция видоспецифических и серогруппоспецифических детерминант *V. cholerae* осуществлялась в ПЦР с применением зарегистрированной тест-системы «АмплиСенс® Vibrio cholerae-FL» с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (гены *wbeT*, *wbfR*, *hlyA* – ПЦР-смесь-1-FRT *V. cholerae* тип) и/или разработанной в Иркутском научно-исследовательском противочумном институте тест-системы для выявления *V. cholerae* O1 и O139 (*wbO1*, *wbO139*, *toxR*) с электрофоретическим учетом результатов.

Секвенирование фрагментов гена *wbO139* выполнялось с использованием набора ABI Prism Big Dye v.3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit на ДНК-анализаторе ABIPrism 3500 Genetic Analyzer [14].

Определение таксономической принадлежности выделенных культур проводилось по комплексу стандартных биохимических и серологических тестов, а также масс-спектрометрически.

Результаты и обсуждение

Иркутская область относится к ША типу по эпидемическим проявлениям холеры, соответственно, мониторинг вибриофлоры поверхностных водоемов на территории осуществляется ежегодно в июле – августе. В поверхностных водоемах области в летний период в отдельные годы обнаруживаются нетоксигенные *V. cholerae* O1, O139 серогрупп или *V. cholerae* R-варианта. Так, за период наблюдения с начала 70-х гг. прошлого столетия из объектов окружающей среды Иркутской области (преимущественно Иркутска) изолировано 280 штаммов холерного вибриона O1 серогруппы и R-варианта. Кроме того, ежегодно в определенных участках водоемов, обозначенных как «участки риска», обнаружаются вибрионы неO1/O139 серогрупп.

В рамках мониторинга объектов окружающей среды Иркутска в течение семи лет осуществлялась оценка эффективности применения ПЦР-скрининга генетических детерминант холерного вибриона в пробах из поверхностных водоемов в ходе бактериологического анализа (первый этап исследования). Учитывая указанные выше данные по обнаружению холерного вибриона на территории, а также необходимость получения при проведении скрининга первичной информации о присутствии вибриона в водоеме, в качестве генетических мишеньей выбраны детерминанты O1/O139 серогрупп и видоспецифические гены (*hlyA*, *toxR*).

При анализе результатов первого этапа исследования установлено, что одновременное обнаружение в ПЦР детерминант O1 серогруппы и видоспецифического гена (*hlyA* или *toxR*) наблюдалось в 11 случаях, и лишь в 8 из них эти данные подтверждены бактериологически выделением культуры *V. cholerae* O1 серогруппы. Что касается видоспецифических детерминант, то их детекция в ПЦР в 268 пробах сопровождалась выделением 151 штамма *V. cholerae* nonO1/O139 (табл. 1).

Следует отметить, что выделение культур *V. cholerae* nonO1/O139 при отрицательном результате ПЦР на наличие видоспецифического гена имело место только в двух случаях. При изучении указанных культур *V. cholerae* nonO1/O139 установлено отсутствие амплификации фрагмента видоспецифического гена *hlyA*, что и обусловило отрицательный результат тестирования в ПЦР сред обогащения. Этот факт определяет необходимость разработки и вне-

Таблица 1 / Table 1

Результаты ПЦР-скрининга проб из объектов окружающей среды на этапе бактериологического анализа

Results of environmental sample screening using PCR at the stage of bacteriological analysis

Количество исследованных проб Number of samples examined	Количество положительных в ПЦР проб Number of PCR-positive samples			Количество бактериологически подтвержденных проб Number of bacteriologically confirmed samples		
	<i>wbeT/wbO1</i>	<i>wbfR/wbO139</i>	<i>hlyA/toxR</i>	<i>V. cholerae</i> O1	<i>V. cholerae</i> O139	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
824	11	20	279	8	0	151

дrenия тест-систем, позволяющих выявлять универсальные видоспецифические гены-мишени, присутствующие в геноме всех представителей *V. cholerae*.

Интерес представляет обнаружение на протяжении трех лет в пробах воды одной из стационарных точек (р. Ангара, Шишиловская протока) гена, детерминирующего биосинтез O139 антигена, одновременно с геном *toxR*. Однако ни в одном случае этот результат не был подтвержден бактериологически. Для исключения ложноположительных результатов проведено определение нуклеотидной последовательности обнаруженного в ПЦР ампликона *wbO139*. Анализ секвенированных фрагментов гена показал их максимальное сходство (на 94–96 %) с депонированными в GenBank нуклеотидными последовательностями гена, отвечающего за синтез O-антитела, у штаммов холерного вибриона O139 серогруппы – *V. cholerae* O139 серогруппы MO45 (№ AB012956) и *V. cholerae* O139 AI-1837 (№ Y07786). Последовательностей с более высоким уровнем гомологии в международных базах данных не выявлено.

В целом удельный вес положительных по результатам молекулярно-генетического скрининга проб (33,9 %) превысил процент положительных проб при бактериологическом исследовании (19,3 %) ($t=6,6$; $p<0,01$). Высокий процент ПЦР-положительных предварительно обогащенных проб в сравнении с результатами бактериологического исследования может свидетельствовать о присутствии в образцах низких концентраций искомого микроорганизма, находящихся за пределами чувствительности бактериологического метода. Не исключено также наличие в пробах вариантов *V. cholerae* в некультивируемом состоянии или персистирующей форме со сниженной метаболической активностью [15–17], не способных к росту на плотных питательных средах. Так, на примере исследования реверсии некультивируемых форм *Salmonella typhimurium* в вегетативное состояние показано, что рекультивация на жидких питательных средах – достаточно длительный процесс и может занимать до 2–3 сут [18]. Существует вероятность того, что кратковременного пребывания холерного вибриона на среде накопления оказывается недостаточно для восстановления способности форм со сниженной метаболической активностью к росту на плотных питательных средах в условиях лаборатории.

С учетом этого на втором этапе исследования проведена оценка динамики накопления ДНК холерного вибриона на 1 пв и 2 пв (условно обозначенная как стандартная схема), а также возможности обнаружения *V. cholerae* при увеличении срока инкубации на среде обогащения и введения в схему анализа 3 пв для ПЦР-положительных бактериологически отрицательных проб (условно обозначенная как расширенная схема). Исследование проводили в рамках мониторинга поверхностных водоемов Иркутска в начале эпидсезона 2017 г. (июль) в течение трех недель.

В результате все включенные в эксперимент исследуемые по стандартной схеме пробы (n=16) оказались ПЦР-позитивными, а культуры холерного вибриона неO1/O139 серогруппы выделены только из девяти. В тестирование по расширенной схеме было включено 13 проб, поскольку на третьей неделе эксперимента из нее исключались пробы, в которых *V. cholerae* nonO1/O139 обнаружен по стандартной схеме. С применением расширенной схемы *V. cholerae* nonO1/O139 выделен дополнительно в четырех пробах (табл. 2).

Во всех случаях обнаружения в ПЦР детерминант холерного вибриона зарегистрировано снижение порогового цикла (Ct) в 1,2–5,2 раза в динамике, свидетельствующее о нарастании концентрации холерного вибриона в пробах при инкубации на средах обогащения и доказывающее выявление при ПЦР-скрининге генетических детерминант жизнеспособных форм микроорганизма. Как было отмечено выше, в четырех пробах культура *V. cholerae* nonO1/O139 выделена только при воздействии расширенной схемы – с 3 пв, исследование которой проводилось при установлении факта снижения Ct на 2 пв в сравнении с 1 пв (рис. 1). В одном случае (4_{т_3} нед) при исследовании пробы по стандартной схеме культура *V. cholerae* nonO1/O139 была выделена только из ила, а по расширенной схеме – из ила и воды.

В трех пробах выявление сигнала в ПЦР и снижение Ct в динамике не сопровождалось выделением культуры ни по стандартной, ни по расширенной схеме (рис. 1). Следует сказать, что все эти пробы демонстрировали отрицательный результат ПЦР при исследовании 1 пв и достаточно поздние циклы с 2 пв после инкубации 6 ч – 30,53; 29,15; 28,1. Тем не менее при исследовании их в динамике прослеживается снижение порогового цикла ПЦР на 2 пв с пролонгированной инкубацией и на 3 пв, что дает основание судить о нарастании концентрации холерного вибриона в пробах. Отсутствие выделения культуры холерного вибриона в этих случаях может быть связано как с низкой его исходной концентрацией в пробе, так и с невозможностью быстрой адаптации микроорганизма к культивированию в лабораторных условиях в начале периода мониторинга. В пользу второго утверждения можно отнести факт обнаружения в более поздние сроки мониторинга (третья неделя эксперимента) культуры *V. cholerae* nonO1/O139 при регистрации в ПЦР порогового цикла на уровне 18,87.

Апробированная расширенная схема исследования для ПЦР-положительных бактериологически отрицательных проб применялась далее при мониторинге поверхностных водоемов в 2017 г. В данный сезон имело место длительное выделение *V. cholerae* O1 серогруппы из одной стационарной точки г. Иркутска – реки Ушаковки (точка № 4). Первые две культуры были выделены 07.08.2017 из стационарной точки при положительном результате ПЦР-

Таблица 2 / Table 2

Результаты ПЦР-скрининга и бактериологического исследования сред накопления в динамике

Results of PCR screening and bacteriological investigation of accumulation media in dynamics

№ точки Point No	ПЦР (Ct) PCR (Ct)		БИ BI	ПЦР (Ct) PCR (Ct)			БИ BI
	1 пв 1 pw*	2 пв_6 ч 2 pw_6 h		2 пв_9 ч 2 pw_9 h	2 пв_24 ч 2 pw_24 h	3 пв 3 pw	
Первая неделя First week							
1	—	29,15	—	20,31	19,21	17,8	—
2	13,41	11,98	—	12,31	7,56	6,04	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
3	8,26	5,11	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	3,57	4,77	4,41	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
4	—	30,53	—	18,51	12,61	18,01	—
5	12,91	10,92	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	5,74	6,43	3,14	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
9	11,85	4,69	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	3,38	5,2	3,02	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
9a	15,48	6,81	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	8,69	5,83	2,95	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
Вторая неделя Second week							
2	—	28,1	—	нп / ns	22,51	24,53	—
3	11,36	6,72	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	нп / ns	3,77	3,69	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
5	—	11,78	—	нп / ns	6,71	7,16	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
Третья неделя Third week							
1	16,51	10,29	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	нп / ns	нп / ns	нп / ns	нп / ns
2	10,9	4,46	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	нп / ns	нп / ns	нп / ns	нп / ns
3	14,16	9,14	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	нп / ns	нп / ns	нп / ns	нп / ns
4	22,48	18,87	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	нп / ns	11,87	14,38	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
5	19,99	13,74	—	нп / ns	10,11	9,66	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
9a	18,77	14,48	—	нп / ns	10,56	11,08	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139

Примечание: БИ – бактериологическое исследование; нп – исследование не проводилось.

Note: BI – bacteriological investigation; ns – not studied; * – peptone water (pw).

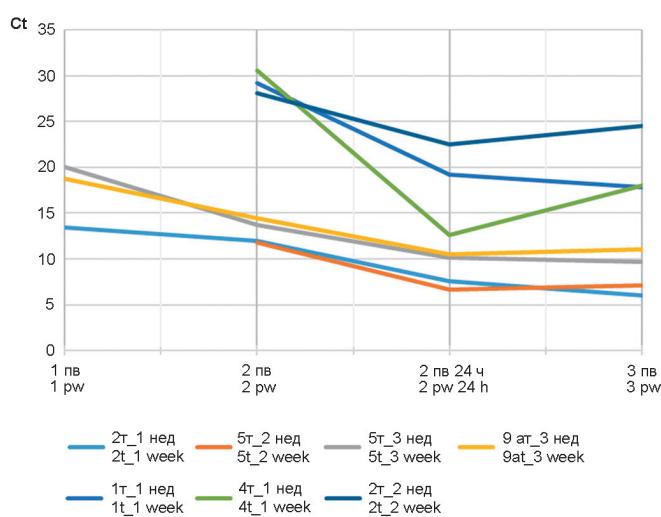


Рис. 1. Динамика изменения Ct в пробах с выделением культуры *V. cholerae* nonO1/O139 с 3 пв (2т_1 нед, 5т_2 нед, 5т_3 нед, 9ат_3 нед) и без выделения *V. cholerae* nonO1/O139 (1т_1 нед, 4т_1 нед, 2т_2 нед)

Fig. 1. Dynamics of Ct variation in samples with *V. cholerae* nonO1/O139 culture isolation from 3 pw (2t_1 week, 5t_2 week, 5t_3 week, 9at_3 week) and without culture isolation (1t_1 week, 4t_1 week, 2t_2 week)

исследования сред обогащения с установленной динамикой нарастания концентрации ДНК в образце из 2 пв по сравнению с 1 пв (рис. 2). Далее при увеличении кратности отбора проб и расширении перечня точек продолжалось выделение культур *V. cholerae* O1 как из стационарной точки, так и из ряда дополнительных. В этот период во всех случаях при получении положительного результата в ПЦР со сред обогащения на наличие детерминант O1 серогруппы и видоспецифического гена изолированы культуры *V. cholerae* O1. Однако позднее в одной из проб (т. 4Г, 18.08) при положительном результате ПЦР с 1 пв и 2 пв колонии, морфологически сходные с холерным вибрионом, не обнаружены. С учетом этого применена расширенная схема – пересев на 3 пв, в высевах из которой обнаружен холерный вибрион O1 серогруппы – *V. cholerae* O1 10-17 (рис. 2).

Полученные результаты оценки эффективности ПЦР-скрининга ставят вопрос о пределе чувствительности молекулярно-генетической детекции детерминант холерного вибриона в обогащенных пробах из поверхностных водоемов и бактериологического метода. С этой целью проведен эксперимент по лабораторному заражению отобранных из поверхностных

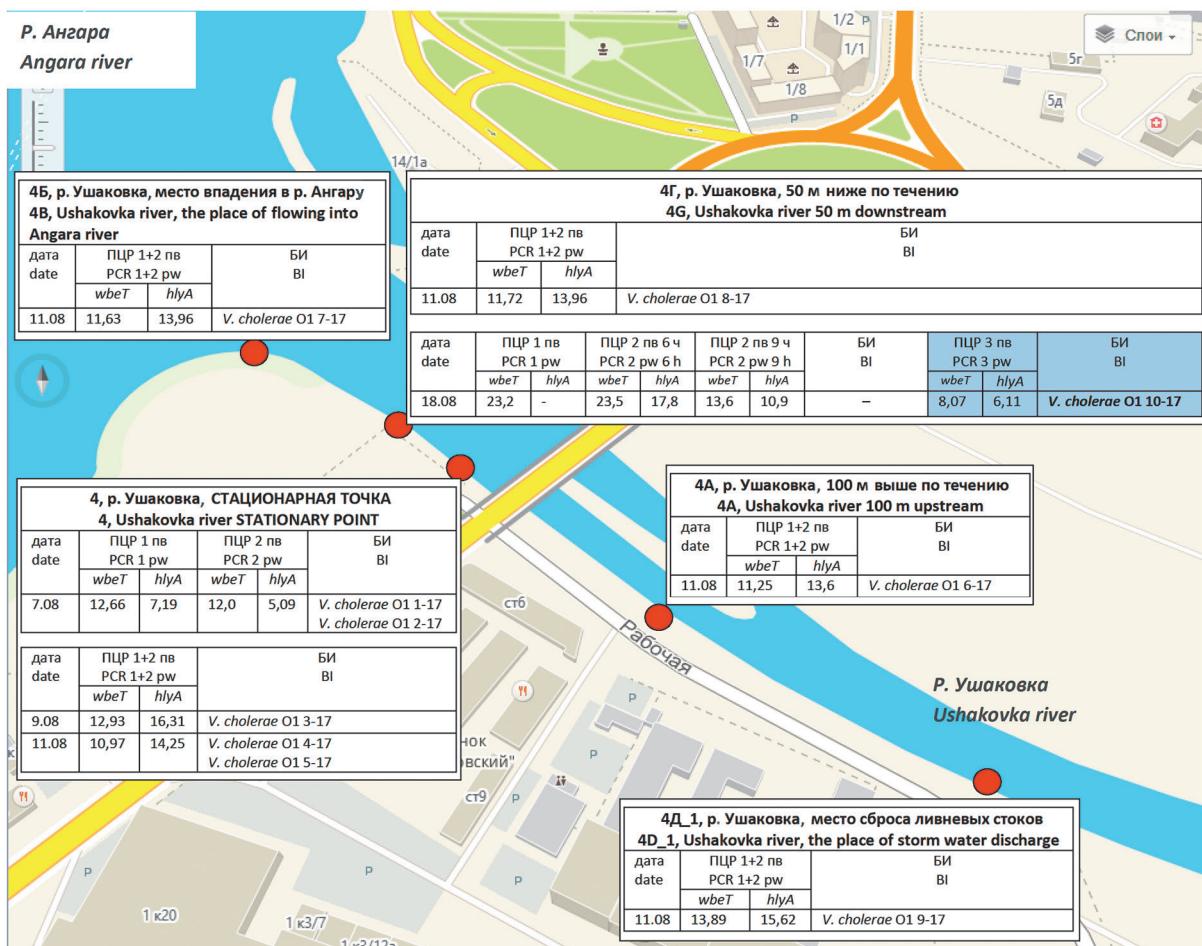


Рис. 2. Схема расположения стационарных и дополнительных точек отбора проб из р. Ушаковки (Иркутск, 2017 г.) и динамика результатов ПЦР в сравнении с бактериологическим анализом:

1 пв – первая среда обогащения (пептонная вода); 2 пв – вторая среда обогащения (пептонная вода); 3 пв – третья среда обогащения (пептонная вода); (1+2) пв – объединенная проба первой и второй сред обогащения; БИ – бактериологическое исследование

Fig. 2. Diagram of stationary and additional sampling points from the Ushakovka river (Irkutsk, 2017) and dynamics of PCR results in comparison with bacteriological analysis:

1 pw – the first enrichment medium (peptone water); 2 pw – the second enrichment medium (peptone water); 3 pw – the third enrichment medium (peptone water); (1+2) pw – combined sample of the first and the second enrichment media; BI – bacteriological investigation

водоемов проб воды взвесью штамма *V. cholerae* O1 El Tor 1-17 в разных концентрациях. В трех сериях эксперимента установлено, что положительный результат ПЦР со средой накопления во всех случаях сопровождался выделением культуры холерного вибриона из контаминированной пробы. При этом вибрион и его генетические детерминанты обнаруживались в разведении до 1 м.к./50 мл пробы во всех сериях эксперимента, в разведении 1 м.к./100 мл – в двух сериях из трех, в остальных разведениях результаты тестирования были отрицательными. Таким образом, при исследовании искусственно контаминированных штаммом *V. cholerae* O1 проб воды не установлено различий чувствительности двух методов обнаружения холерного вибриона.

Расхождение результатов исследования искусственно контаминированных холерным вибрионом проб воды и обогащенных на питательных средах нативных проб из поверхностных водоемов обусловлено, по всей вероятности, особенностями ме-

таболизма и адаптации микроорганизма в разных условиях среды. Следует отметить, что в рамках данного исследования максимальное количество ПЦР-положительных проб с бактериологическим подтверждением приходится на *V. cholerae* nonO1/O139. Вибрионы неO1/O139 серогрупп обнаружаются ежегодно в участках риска водоемов Иркутска и характеризуются широким генетическим разнообразием, и есть основания полагать, что они относятся к аутохтонной микрофлоре водных объектов. С учетом природно-климатических особенностей территории в качестве одной из стратегий адаптации и сохранения *V. cholerae* nonO1/O139 в межсезонный период может рассматриваться их переход в некультивируемое состояние с последующей поэтапной реверсией в вегетативные формы при оптимальных параметрах среды (повышение температуры, увеличение количества питательных веществ и т.д.). Известно, что возможность реверсии в вегетативную форму и обнаружения микроорганизмов рода *Vibrio* в окру-

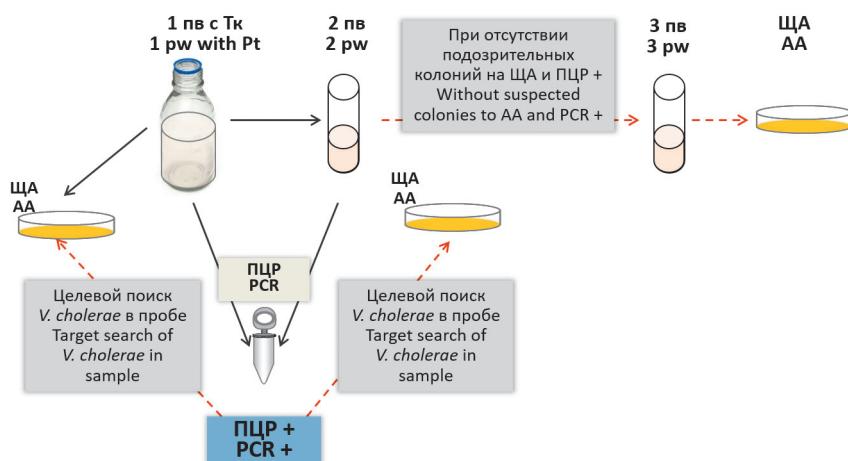


Рис. 3. Схема исследования проб из объектов окружающей среды на наличие холерного вибриона с включением ПЦР-скрининга:
pw – пептонная вода; ЩА – щелочной агар; Tk – теллурит калия

Fig. 3. Diagram of environmental sample examinations for *V. cholerae* with incorporation of PCR screening:

pw – peptone water; AA – alkaline agar; Pt – potassium tellurite

жающей среде коррелирует с температурой воды, концентрацией биогенных веществ в водоеме, численностью фито- и зоопланктона [17, 19, 20].

В начале летнего сезона, когда не достигнут температурный и субстратный оптимум, вибрионы в водоемах могут существовать в покоящейся или переходной формах, для восстановления способности к росту которых, возможно, требуются более длительные условия культивирования. Кроме того, пребывание в водной окружающей среде и культивирование холерного вибриона в лабораторных условиях связаны с необходимостью утилизации различных субстратов для обеспечения жизнедеятельности микроорганизма, что требует переключения метаболических процессов в клетке. Указанными причинами можно объяснить обнаружение вибрионов в пробах воды при увеличении сроков культивирования и введении дополнительных пассажей на питательных средах.

В целом результаты комплексного исследования дают основание рекомендовать проведение ПЦР-скрининга в лабораториях федерального, регионального, а также территориального (имеющих разрешение на работу с микроорганизмами II группы патогенности) уровней при мониторинговых исследованиях вириофлоры проб из объектов окружающей среды после их предварительного обогащения на жидких питательных средах. Эпидемиологическая эффективность такого подхода заключается в оперативном получении информации о присутствии в образце детерминант холерного вибриона до выделения культуры, что служит основанием для целенаправленного поиска указанного микроорганизма в пробе и подключения при необходимости расширенной схемы исследования (рис. 3). В установленном очаге холеры результаты ПЦР-скрининга проб из объектов окружающей среды могут служить основанием для проведения противоэпидемических мероприятий. С точки зрения экономической эффективности применение данного подхода может быть направлено на оптимизацию объемов бактериологического исследования за счет исключения из дальнейшего анализа ПЦР-отрицательных проб. Снижения финансовых

затрат можно достичнуть и за счет исследования в ПЦР объединенных проб, отобранных в расположенных на одном водном объекте и территориально связанных стационарных точках, а также за счет смешения акцентов при проведении мониторинговых исследований на участки риска, минимизировав при этом проведение анализа в стационарных точках, где микроорганизмы рода *Vibrio* не обнаруживаются на протяжении длительного времени. Учитывая тот факт, что для первичного заключения о присутствии холерного вибриона в исследуемой пробе достаточно обнаружения его видоспецифических и серогруппопоспецифических детерминант, целесообразны разработка и внедрение в практику ПЦР-тест-систем с ограниченным спектром тестируемых генов, что существенно снизит стоимость скринингового исследования.

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

Список литературы

- Онищенко Г.Г., Марамович А.С., Голубинский Е.П., Маслов Д.В., Вершкова Т.И., Урбанович Л.Я., Алленов А.В., Мурнаев Г.П., Гарковенко Л.Е., Воронок В.М. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 1. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры Эль Тор в г. Владивосток. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000; 5:26–31.
- Онищенко Г.Г., Марамович А.С., Голубинский Е.П., Папиренко Е.В., Ганин В.С., Бурый В.Л., Морозова И.В., Мартынова Т.М. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 2. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры Эль Тор в г. Южно-Сахалинск. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000; 5:31–5.
- Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Мишанькин Б.Н., Мазрухо Б.Л., Подосинникова Л.С., Кудрякова Т.А., Москвитина Э.А., Водопьянов С.О., Рыжко И.В., Казакова Е.С., Шарова И.Н., Плотникова Е.А., Давыдова Н.А., Абрамова Е.Г., Королев Ю.С., Шестигалтынова И.С., Шарифуллина Д.М., Куряева Н.Ю., Юмангулова Е.Ф., Чернышева А.В., Бугоркова Т.В., Русакова Т.Г., Масленикова А.Л., Милова М.В., Захарова Л.И., Билалов Т.Г., Шутъко А.Г., Качкина Г.В. Характеристика холерных вирионов Эль Тор, выделенных в г. Казань в 2001 г. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2002; 2:3–6.
- Ратникова Л.И., Кузьмина Н.Я. Случай холеры в Челябинске. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2002; 2:53–4.
- Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С.Ю., Прометной В.И., Монахова Е.В., Водопьянов С.О., Телесманич Н.Р., Дудина Н.А. Холера, обусловленная *V. cholerae* O1 ctxAB-tcpA+. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007; 1:23–9.

6. Luo Y., Octavia S., Jin D., Ye J., Miao Z., Jiang T., Xia S., Lan R. US Gulf-like toxicogenic O1 *Vibrio cholerae* causing sporadic cholera outbreaks in China. *J. Infect.* 2016; 72(5):564–72. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.02.005.
7. Wang H., Yang C., Sun Z., Zheng W., Zhang W., Yu H., Wu Y., Didelot X., Yang R., Pan J., Cui Y. Genomic epidemiology of *Vibrio cholerae* reveals the regional and global spread of two epidemic non-toxigenic lineages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008046. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008046.
8. Монахова Е.В., Архангельская И.В. Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 2:14–23. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-14-23.
9. 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.
10. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербакова С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 1:89–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-1-89-101.
11. Шарова И.Н., Казакова Е.С., Портенко С.А., Красовская Т.Ю., Осина Н.А., Кукулев В.Е., Карнаухов И.Г., Щербакова С.А., Топорков А.В., Чеснокова М.В., Кулличенко А.Н., Кутырев В.В. Совершенствование и стандартизация лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 2:46–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-46-48.
12. Онищенко Г.Г., Ежова Е.Б., Демина Ю.В., Мельникова А.А. О мерах по совершенствованию эпидемиологического надзора в части индикации возбудителей инфекционных заболеваний. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2013; 2:4–13.
13. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine*. 2020; 38(1):A73–A82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.
14. Миронова Л.В., Басов Е.А., Афанасьев М.В., Хунхеева Ж.Ю., Миткеева С.К., Ганин В.С., Урбанович Л.Я., Кулакалова Е.С., Гольдапель Э.Г., Балахонов С.В. MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ с молекулярно-генетической идентификацией *Vibrio* spp. в системе мониторинга вибриофлоры поверхности водоемов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 19(6):27–36. DOI: 10.17816/EID40838.
15. Brenzinger S., van der Aart L.T., van Wezel G.P., Lacroix J.M., Glatter T., Briegel A. Structural and proteomic changes in viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol.* 2019; 10:793. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00793.
16. Jubair M., Morris J.G. Jr., Ali A. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel “persister” phenotype. *PLoS One*. 2012; 7(9):e45187. DOI: 10.1371/journal.pone.0045187.
17. 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.
18. Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Гинцбург А.Л. Некультивируемое состояние у патогенных бактерий на модели *Salmonella typhimurium*: феномен и генетический контроль. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1997; 4:35–41.
19. Lutz C., Erken M., Noorian 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.
20. Меньшикова Е.А., Архангельская И.В., Левченко Д.А., Курбатова Е.М., Кругликов В.Д., Титова С.В. Влияние температурных флуктуаций воды поверхностных водоемов города Ростова-на-Дону на циркуляцию холерных вибрионов. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2018; 14(4):14–20.
1. Onishchenko G.G., Maramovich A.S., Golubinsky E.P., Maslov D.V., Vershkova T.I., Urbanovich L.Ya., Allenov A.V., Murnachev G.P., Garkovenko L.E., Voronok V.M. [Cholera in the Russian Far East. Communication 1. Epidemiological characteristics of the El Tor cholera outbreak in Vladivostok]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2000; 5:26–31.
2. Onishchenko G.G., Maramovich A.S., Golubinsky E.P., Papirenko E.V., Ganin V.S., Bury V.L., Morozova I.V., Martynova T.M. [Cholera in the Russian Far East. Communication 2. Epidemiological characteristics of the El Tor cholera outbreak in Yuzhno-Sakhalinsk]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2000; 5:31–5.
3. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Mishan'kin B.N., Mazrukho B.L., Podosinnikova L.S., Kudryakova T.A., Moskvitina E.A., Vodop'yanov S.O., Ryzhko I.V., Kazakova E.S., Sharova I.N., Plotnikova E.A., Davydova N.A., Abramova E.G., Korolev Yu.S., Shestialtyanova I.S., Sharifulina D.M., Kuryaeva N.Yu., Yumangulova E.F., Chernysheva A.V., Bugorkova T.V., Rusakova T.G., Maslenikova A.L., Milova M.V., Zakharova L.I., Bilalov T.G., Shut'ko A.G., Kachkina G.V. [Characteristics of El Tor cholera vibrios isolated in Kazan in 2001]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2002; 2:3–6.
4. Ratnikova L.I., Kuz'mina N.Ya. [Cholera case in Chelyabinsk]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2002; 2:53–4.
5. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Podosinnikova L.S., Vodyanitskaya S.Yu., Prometnoy V.I., Monakhova E.V., Vodop'yanov C.O., Telesmanich N.R., Dudina N.A. [Cholera caused by *V. cholerae* O1 ctxAB-tcpA+]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2007; 1:23–9.
6. Luo Y., Octavia S., Jin D., Ye J., Miao Z., Jiang T., Xia S., Lan R. US Gulf-like toxicogenic O1 *Vibrio cholerae* causing sporadic cholera outbreaks in China. *J. Infect.* 2016; 72(5):564–72. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.02.005.
7. Wang H., Yang C., Sun Z., Zheng W., Zhang W., Yu H., Wu Y., Didelot X., Yang R., Pan J., Cui Y. Genomic epidemiology of *Vibrio cholerae* reveals the regional and global spread of two epidemic non-toxigenic lineages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008046. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008046.
8. Monakhova E.V., Arkhangelskaya I.V. [Cholera vibrios of nonO1/nonO139 serogroups in etiology of acute intestinal infections: current situation in Russia and around the world]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (2):14–23. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-14-23.
9. Kruglikov V.D., Levenchenko D.A., Titova S.V., Moskvitina E.A., Arkhangelskaya I.V., Gaevskaya N.E., Ezhova M.I. [Cholera vibrios in the water bodies 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.
10. Onischenko G.G., Popova A.Yu., Kutyrev V.V., Smirnova N.I., Scherbakova S.A., Moskvitina E.A., Titova S.V. [Actual problems of epidemiologic control, laboratory diagnostics and prophylaxis of cholera in the Russian Federation]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2016; 1:89–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-1-89-101.
11. Sharova I.N., Kazakova E.S., Portenko S.A., Krasovskaya T.Yu., Osina N.A., Kuklev V.E., Karnaughov I.G., Shcherbakova S.A., Toporkov A.V., Chesnokova M.V., Kulichenko A.N., Kutyrev V.V. [Improvement and standardization of laboratory diagnostics procedures as concerns particularly dangerous, “emerging”, and “re-emerging” infectious diseases]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (2):46–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-46-48.
12. Onishchenko G.G., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Mel'nikova A.A. [On measures to improve epidemiological surveillance in terms of indication of pathogens of infectious diseases]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Topical Issues]*. 2013; 2:4–13.
13. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine*. 2020; 38(1):A73–A82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.
14. Mironova L.V., Basov E.A., Afanas'ev M.V., Khunkheeva Zh.Yu., Mitkeeva S.K., Ganin V.S., Urbanovich L.Ya., Kulikalova E.S., Gol'dapel E.G., Balakhonov S.V. [MALDI-ToF mass spectrometric analysis with molecular-genetic identification of *Vibrio* spp. in the system of monitoring over vibrioflora of surface water bodies]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2014; 19(6):27–36. DOI: 10.17816/EID40838.
15. Brenzinger S., van der Aart L.T., van Wezel G.P., Lacroix J.M., Glatter T., Briegel A. Structural and proteomic changes in viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 2019; 10:793. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00793.
16. Jubair M., Morris J.G. Jr., Ali A. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel “persister” phenotype. *PLoS One*. 2012; 7(9):e45187. DOI: 10.1371/journal.pone.0045187.
17. 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.

References

1. Onishchenko G.G., Maramovich A.S., Golubinsky E.P., Maslov D.V., Vershkova T.I., Urbanovich L.Ya., Allenov A.V., Murnachev G.P., Garkovenko L.E., Voronok V.M. [Cholera in the Russian Far East. Communication 1. Epidemiological characteristics of the El Tor cholera outbreak in Vladivostok]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2000; 5:26–31.
2. Onishchenko G.G., Maramovich A.S., Golubinsky E.P.,

18. Romanova Yu.M., Alekseeva N.V., Gintzburg A.L. [Non-cultivated state in pathogenic bacteria in the *Salmonella typhimurium* model: phenomenon and genetic control]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1997; 4:35–41.

19. Lutz C., Erken M., Noorian 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.

20. Men'shikova E.A., Arkhangel'skaya I.V., Levchenko D.A., Kurbatova E.M., Kruglikov V.D., Titova S.V. [Effect of temperature fluctuations in surface water bodies of the Rostov-on-Don city on the circulation of *Vibrio cholerae*]. *[Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov]*. 2018; 14(4):14–20.

Authors:

Mironova L.V., Ponomareva A.S., Basov E.A., Fedotova I.S., Khunkheeva Zh.Yu., Fortunatova A.V., Bochalgin N.O., Gladkikh A.S., Urbanovich L.Ya., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilisserra St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Миронова Л.В., Пономарева А.С., Басов Е.А., Федотова И.С., Хунхеева Ж.Ю., Фортунатова А.В., Бочагин Н.О., Гладких А.С., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

А.Я. Никитин, М.В. Чеснокова, С.В. Балахонов

АЛГОРИТМ И РЕЗУЛЬТАТЫ КРАТКОСРОЧНОГО ПРОГНОЗА ИЗМЕНЕНИЯ КОЭФФИЦИЕНТА РАСПРОСТРАНЕНИЯ COVID-19 В СУБЪЕКТАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск,
Российская Федерация*

Во многих субъектах Российской Федерации к концу лета 2020 г. произошло снижение числа случаев проявления коронавирусной инфекции. Тем не менее эта болезнь остается актуальной проблемой для здравоохранения и экономики страны, не исключена возможность возникновения второй волны заболеваемости. Одним из наиболее важных показателей, используемых при обосновании перехода к очередному этапу снятия/введения ограничительных мероприятий по COVID-19, является коэффициент распространения инфекции (R_t). Цель исследования – описать алгоритм анализа и краткосрочного прогноза коэффициента распространения коронавирусной инфекции, оценить соответствие теоретически ожидаемых и фактических значений этого показателя. **Материалы и методы.** Описана процедура проведения краткосрочного экстраполяционного прогноза R_t в десяти субъектах РФ в зависимости от наличия или отсутствия трендов изменения показателя с расчетом 95 % доверительного интервала возможных изменений его значения. **Результаты и обсуждение.** Предлагается проводить прогноз R_t на основе усреднения материалов за неделю, сочетая регрессионный анализ и экспертную оценку характера динамики временных рядов для своевременного перехода от прогноза по тренду к экстраполяции стационарных последовательностей наблюдений, и наоборот. Показано, что прогнозируемые значения R_t статистически достоверно не отличаются от фактических. При принятии управлеченческих решений по профилактике COVID-19 особо следует обращать внимание на случаи, когда фактическое значение R_t превышает верхнюю границу доверительного интервала. В исследуемых субъектах при прогнозировании значения R_t на 33–35-ю календарные недели выявлено шесть (20,0 %) таких случаев. Три из них зарегистрировано в Забайкальском крае, где наблюдался тренд на рост R_t , что требует анализа причин этого явления. Предлагаемый алгоритм анализа и прогноза величины R_t , апробированный на данных по десяти субъектам России, дает корректную информацию для решений по снятию/введению ограничительных мер для профилактики COVID-19.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, коэффициент распространения инфекции, временные ряды, прогноз.

Корреспондирующий автор: Никитин Алексей Яковлевич, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Для цитирования: Никитин А.Я., Чеснокова М.В., Балахонов С.В. Алгоритм и результаты краткосрочного прогноза изменения коэффициента распространения COVID-19 в субъектах Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 3:98–105. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-98-105.

Поступила 24.09.2020. Отправлена на доработку 13.11.2020. Принята к публ. 24.11.2020.

A.Ya. Nikitin, M.V. Chesnokova, S.V. Balakhonov

Algorithm and Results of Short-Term Forecast of Changes in the COVID-19 Spread Coefficient in the Constituent Entities of the Russian Federation

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. There was a decrease in the number of COVID-19 cases across many entities of the Russian Federation towards the end of summer season-2020. However, the disease remains a relevant threat to the public health and economy and the possibility of a second epidemic wave is not excluded. Rate of infection transmission (R_t) is one of the most important indicators to justify the transition to next stage of removing/introducing restrictive measures on COVID-19. **Objective** of the work was to describe the algorithm of analysis and short-term forecast of coronavirus spread rate, to assess correspondence between theoretically expected and actual values of this indicator. **Materials and methods.** Procedure for making a short-term extrapolation forecast of R_t in 10 RF constituent entities, depending on the presence or absence of indicator trends with calculation of a 95 % confidence interval of possible changes in its value is provided. **Results and discussion.** It is proposed to carry out R_t forecast based on averaged values over a week, combining regression analysis and expert assessment of time series dynamics nature for prompt transition from trend forecasting to extrapolation of stationary observation sequences and vice versa. It has been demonstrated that predicted R_t values are not statistically different from actual values. When making managerial decisions on COVID-19 prevention, special attention should be paid to cases when actual value of R_t exceeds the upper limit of confidence interval. Six (20.0 %) such cases were detected in surveyed entities on calendar weeks 33–35. Three of them were registered in Trans-Baikal Territory, where upward trend was reported during that period of time. The cause of this phenomenon should be analyzed. The put forward algorithm of analysis and forecasting of the R_t value changes, which was tested in 10 entities of Russia, provides a reliable basis for making management decisions on removing/introducing restrictive measures for COVID-19 prevention.

Key words: coronavirus infection, rate of infection spread, time series, forecast.

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

Corresponding author: Aleksey Ya. Nikitin, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Nikitin A.Ya., Chesnokova M.V., Balakhonov S.V. Algorithm and Results of Short-Term Forecast of Changes in the COVID-19 Spread Coefficient in the Constituent Entities of the Russian Federation. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:98–105. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-98-105.

Received 24.09.2020. Revised 13.11.2020. Accepted 24.11.2020.

Nikitin A.Ya., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3918-7832>
 Chesnokova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5489-9363>
 Balakhonov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Стремительное распространение новой коронавирусной инфекции COVID-19 вызвало чрезвычайную ситуацию с заболеваемостью населения во всем мире, о чем Всемирной организацией здравоохранения официально объявлено 30 января 2020 г. [1–3]. В Российской Федерации на 20.08.2020 в 85 субъектах страны выявлено 942106 больных COVID-19 [4]. Для изучения и прогноза динамики эпидемического процесса COVID-19 российскими и зарубежными специалистами оперативно созданы математические модели, позволяющие предсказывать периоды наступления экстремумов заболеваемости, смертности и другие показатели, которые необходимы для разработки и развития стратегии мер профилактики коронавирусной инфекции [2, 5–7]. Организованные в субъектах страны мероприятия неспецифической профилактики к концу лета 2020 г. обеспечили на территории большинства из них стабилизацию активности эпидемического процесса COVID-19, сформировали условия для поэтапной отмены ранее введенных ограничений.

Согласно методическим рекомендациям «Определение комплекса мероприятий, а также показателей, являющихся основанием для поэтапного снятия ограничительных мероприятий в условиях эпидемического распространения COVID-19» (МР 3.1.0178-20.3.1) наиболее важным из трех показателей, которые учитываются при обосновании перехода к очередному этапу снятия/введения ограничительных мер в условиях эпидемического распространения COVID-19, является коэффициент распространения инфекции (R_t). Этот индекс отражает среднее число людей, инфицируемых одним больным до его изоляции. В этом же документе приведен алгоритм расчета ежедневного R_t , который основан на делении суммы числа больных, зарегистрированных в течение последних четырех суток, на сумму числа больных за аналогичный предыдущий период времени. Указано, что при $R_t \leq 1$ с учетом значения других показателей в субъектах допустимо начинать переход к I этапу снятия санитарных ограничительных мероприятий. Аналогично при значениях $R_t > 1$, особенно в ситуациях дальнейшего увеличения показателя, необходимо вводить более строгие ограничительные меры. Отметим, что значение $R_t = 1$ будет регистрироваться и в случае 50 ежедневных случаев COVID-19, и при 550. То есть этот показатель не подходит для оценки эпидемиологической обстановки, он указывает на наличие у инфекции потенциала к эпидемическому распространению в популяции [8, 9] и в соответствии с рекомендациями (МР 3.1.0178-20.3.1) используется утилитарно как критерий для выбора оптимальной стратегии мер профилактики. В случае

же эпидемического процесса новой коронавирусной инфекции описание проводится в рамках отдельных стран или регионов по целому комплексу показателей, с учетом половозрастной структуры, социального статуса населения, тяжести проявления болезни, готовности медучреждений и т.д. [9–12].

Цель исследования – описать алгоритм анализа и краткосрочного прогноза коэффициента распространения коронавирусной инфекции, оценить соответствие теоретически ожидаемых и фактических значений этого показателя.

Материалы и методы

Сведения об основных проявлениях новой коронавирусной инфекции получали в ежедневном режиме из управлений Роспотребнадзора и центров гигиены и эпидемиологии десяти субъектов Сибирского и Дальневосточного федеральных округов РФ. Ретроспективный эпидемиологический анализ включал ежедневную оценку числа случаев COVID-19 в субъектах, нахождение ежедневных и средних за неделю значений R_t .

Временные ряды значений R_t представлялись в виде графиков. Длина исходных временных рядов значений R_t варьировала от 23 (Красноярский край) до 18 (Республика Алтай) наблюдений. Длина фрагментов, на основе которых проводили прогноз, составляла от 5 до 23 наблюдений.

Алгоритм анализа и прогноза R_t . Для принятия управленческих решений в субъектах РФ о поэтапном снятии/введении ограничительных мер расчет R_t должен проводиться с упреждением. В качестве периода анализа и упреждения мы предлагаем брать семь дней, рассчитывая среднюю величину R_t по отдельным дням с понедельника до воскресенья включительно. В результате формируется временной ряд, состоящий из усредненных недельных значений R_t по субъекту. Соответственно, и краткосрочный прогноз R_t будет дан на следующую неделю. Усреднение показателя по недельным отрезкам сглаживает ежедневные случайные его колебания, а по величине временного интервала удобно для введения превентивных мер профилактики коронавирусной инфекции.

Алгоритм собственно прогноза включает три этапа. На первом этапе с помощью регрессионного анализа проверяется, содержит или нет анализируемая последовательность линейный тренд. Второй этап представлен собственно прогнозом. Если тренда нет, временной ряд рассматривается как стационарный, а в качестве ожидаемого на будущую неделю показателя R_t принимается среднее для базис-

ного (анализируемого) периода значение с расчетом 95 % доверительного интервала (ДИ) возможных случайных изменений. При обнаружении значимого тренда прогноз R_t осуществляется по линейному уравнению, а вычисление 95 % ДИ проводится с учетом показателя колеблемости временного ряда [13]. Прогноз всегда строится на шаг вперед, а базовый период наблюдений постоянно возрастает на единицу. Третий, дополнительный, этап предполагает проведение экспертной оценки поведения временного ряда с целью его фрагментации на отрезки с одинаковым типом динамики. Анализ графиков изменения значений R_t позволяет визуально (неизбежно с временным запаздыванием) установить, что динамика показателя перешла из стационарной фазы к тренду или наоборот. Предположение о тренде проверяется с помощью статистического анализа (описан выше – первый этап). Для дальнейшего прогнозирования берется укороченный, но соответствующий фактической фазе эпидемического процесса ряд значений показателя R_t . Оптимальность такого подхода к изучению динамики R_t будет показана ниже.

Одной из задач статьи является анализ величины отклонений (ошибки) данных, полученных при прогнозе, от фактических значений R_t . В случае верного прогноза между ожидаемыми и наблюдаемыми значениями показателя статистически значимые различия должны отсутствовать ($P>0,05$). В данной работе проведено разовое (на определенный момент времени) сопоставление результатов прогноза R_t в десяти субъектах страны с данными фактических значений этого показателя. Сравнение выборок проводили с применением парного двухвыборочного t -теста для средних величин по данным за 33–35-ю календарную неделю (к.н.).

Все расчеты (линий регрессии, средних показателей и их ошибок, ДИ, значений критерия Стьюдента) выполнены стандартными методами вариационной статистики [13, 14] с использованием пакета прикладной программы Excel. Значимыми считали различия при уровне вероятности (P) ниже 0,05.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены временные ряды динамики R_t на территории анализируемых субъектов Дальневосточного и Сибирского федеральных округов. Из графиков следует, что динамика R_t характеризуется временными и пространственными особенностями. Кроме того, так как первые случаи коронавирусной инфекции в субъектах стали регистрироваться не одновременно, то длина временных рядов не одинакова. Отметим, что графики не показывают начало регистрации случаев коронавирусной инфекции в субъектах. Они отражают длину временных рядов со времени, когда был рассчитан первый средний за семь дней показатель R_t .

В соответствии с третьим этапом алгоритма

анализа динамики R_t , ряды наблюдений разбивались на отдельные однотипные по характеру изменчивости участки. Так как в основе предлагаемого подхода не лежит определенная статистическая процедура, то этот этап анализа мы называем экспертным. Примененный подход позволяет более оперативно вводить процедуру коррекции прогноза, что крайне важно для своевременного принятия управлеченческих решений в период эпидемических осложнений. С целью предотвращения ситуации, когда эпидемиологическая опасность будет недооценена, целесообразно в период обострения эпидемического процесса стремиться делать более ранний переход от прогноза по стационарному ряду к расчету ожидаемых значений по линейному тренду. И наоборот, в период стабилизации и снижения эпидемиологической напряженности предпочтительно по возможности быстро переходить от прогноза по тренду к прогнозу по стационарному ряду.

Из приводимых графиков очевидно, что характер процесса и, соответственно, подходы к прогнозу на отрезках 13–20-й к.н. (в некоторых субъектах и дольше) и более поздних достаточно сильно отличаются. Рассмотрение всего временного ряда значений R_t лишь увеличит ошибку, что, несмотря на снижение величины критерия Стьюдента (t) с увеличением числа наблюдений, приведет к расширению границ доверительного интервала, смещению точечного прогноза. В итоге это только осложнит оперативное принятие решения о возможности перехода к тому или иному этапу снятия/введения ограничительных мер. Так как задача прогнозирования процесса впервые поставлена на 26-й к.н. (22.06–28.06), то и для расчета ожидаемых значений R_t взяты более короткие временные ряды без учета начального отрезка формирования эпидемического процесса в субъектах. Ниже для каждого из десяти субъектов рассмотрены примененный для них подход к выделению фрагментов и способ прогнозирования усредненных за неделю значений R_t .

Республика Алтай (рис. 1.1). По вышеприведенным соображениям для прогноза на текущий период времени взят фрагмент временного ряда значений R_t с 23-й к.н. (01.06–07.06) по 35-ю к.н. (24.08–30.08). Этот ряд представлен значимым трендом ($P<0,05$) снижения показателя, поэтому в основу прогноза положено линейное уравнение. Его результаты для 33–35-й к.н. представлены далее в таблице и по тексту.

Республика Бурятия (рис. 1.2). Фрагмент временного ряда наблюдений с 21-й к.н. (18.05–24.05) по 35-ю к.н. (24.08–30.08) является стационарным, что и использовано при экстраполяции значений R_t на 33–34-й к.н. (таблица) и для 35-й к.н. (по тексту).

Республика Тыва (рис. 1.3). Временной ряд разбит на три фрагмента. Первый включает отрезок с 17-й к.н. (20.04–26.04) по 20-ю к.н. (11.05–17.05), который мы исключили из анализа как период начального формирования эпидемического процесса.

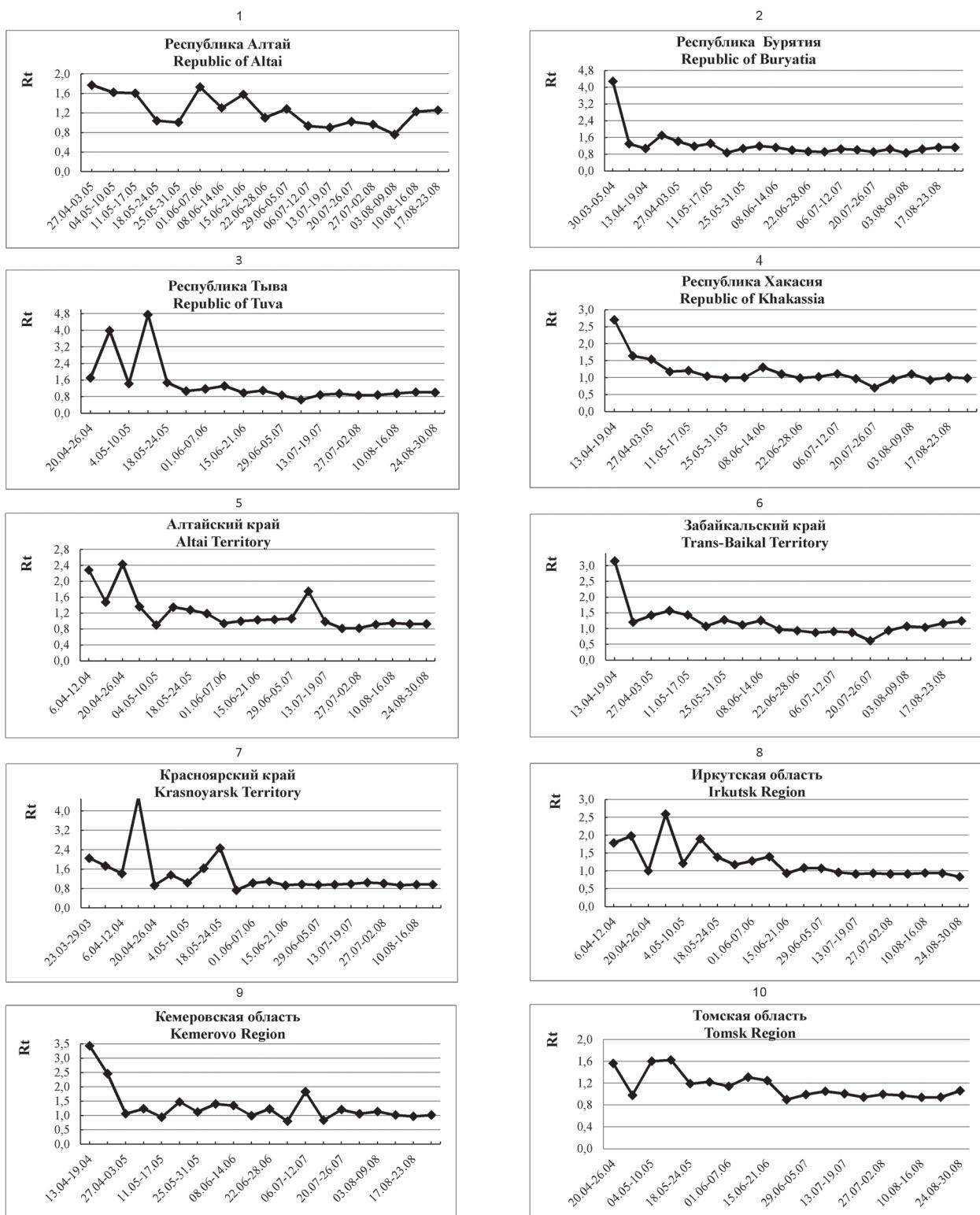


Рис. 1. Динамика коэффициента распространения инфекции (Rt) на территории субъектов Российской Федерации (от начала пандемии до 36-й календарной недели)

Fig. 1. Dynamics of infection spread rate (Rt) in the territory of the constituent entities of the Russian Federation (from the onset of pandemic till the 36th calendar week)

Фрагмент с 21-й (18.05–24.05) до 27-й к.н. (29.06–05.08) содержит значимый тренд на уменьшение значений Rt. Третий фрагмент начиная с 34-й к.н. (17.08–23.08) характеризуется достоверным ($P<0,05$) ростом значений Rt, что учтено при прогнозе на 33–34-ю к.н. (таблица) и для 35-й к.н. (по тексту).

Республика Хакасия (рис. 1.4). Временной ряд с 16-й к.н. (13.04–19.04) имеет значимый ($P<0,01$) тренд на снижение. Выделение фрагментов ряда не проводили, хотя, судя по графику (рис. 1.4), при формировании очередных прогнозов отрезок с 30-й к.н. (20.07–26.07) по 35-ю к.н. (24.08–30.08) необ-

Фактические и ожидаемые значения коэффициента распространения инфекции на 33-ю (10.08–16.08) и 34-ю (17.08–23.08) календарные недели в десяти субъектах Российской Федерации

Actual and expected values of infection spread rate for 33rd (10.08–16.08) and 34th (17.08–23.08) calendar weeks in 10 entities of the Russian Federation

Субъект Entity	Rt за 33-ю к.н.		Rt for 33rd calendar week		Тип ряда Type of series		Границы 95 % доверительного интервала Limits of 95 % confidence interval		Rt за 34-ю к.н.		Rt for 34th calendar week		Тип ряда Type of series	Границы 95 % ДИ Limits of the 95 % confidence interval		
	фактический actual	ожидаемый expected	нижняя lower	верхняя top	фактический actual	ожидаемый expected	нижняя lower	верхняя top	фактический actual	ожидаемый expected	нижняя lower	верхняя top		нижняя lower	верхняя top	
Республика Алтай Republic of Altai	1,230	0,664	с трендом with trend	0,198	1,368	1,260	0,783	с трендом with trend	0,198	0,198	0,198	1,368				
Республика Бурятия Republic of Buryatia	1,048	1,004	стационарный stationary	0,938	1,070	1,131	1,008	стационарный stationary	0,947	0,947	0,947	1,068				
Республика Тыва Republic of Tuva	0,956	0,716	с трендом with trend	0,303	1,129	1,027	0,758	с трендом with trend	0,345	0,345	0,345	1,171				
Республика Хакасия Republic of Khakassia	0,934	1,086	с трендом with trend	0,982	1,190	1,015	0,875	с трендом with trend	0,514	0,514	0,514	1,236				
Алтайский край Altai Territory	0,958	1,080	стационарный stationary	0,937	1,224	0,929	1,072	стационарный stationary	0,938	0,938	0,938	1,206				
Забайкальский край Trans-Baikal Territory	1,045	0,903	стационарный stationary	0,792	1,015	1,170	0,920	стационарный stationary	0,816	0,816	0,816	1,021				
Красноярский край Krasnoyarsk Territory	0,969	0,974	стационарный stationary	0,912	1,036	0,972	0,974	стационарный stationary	0,918	0,918	0,918	1,030				
Иркутская область Irkutsk Region	0,943	0,970	стационарный stationary	0,911	1,030	0,941	0,967	стационарный stationary	0,916	0,916	0,916	1,019				
Кемеровская область Kemerovo Region	1,021	1,183	стационарный stationary	1,037	1,330	0,974	1,173	стационарный stationary	1,035	1,035	1,035	1,311				
Томская область Tomsk Region	0,942	0,984	стационарный stationary	0,939	1,029	0,947	0,979	стационарный stationary	0,939	0,939	0,939	1,018				
Оценка существенности различий между фактическими и ожидаемыми значениями Rt Assessing the significance of differences between actual and expected Rt values	$t=1,31; P>0,05$		-		$t=1,61; P>0,05$		-		-		-		-		-	

ходимо будет рассматривать как стационарный временной ряд.

Алтайский край (рис. 1.5). Временной ряд значений Rt включает два фрагмента. Отрезок с 15-й к.н. (06.04–12.04) по 18-ю к.н. (27.04–03.05) исключили из анализа. Фрагмент с 19-й (04.05–10.05) по 35-ю к.н. (24.08–30.08) рассматривали как стационарный, на основе которого проведен расчет значений показателя для 33–34-й к.н. (таблица) и 35-й к.н. (по тексту).

Забайкальский край (рис. 1.6). Временной ряд экспертино разбит на несколько фрагментов. Причем проведено сравнение результатов прогноза

значений Rt с учетом меняющегося типа временного ряда, соответственно, его длины при проведении расчетов (рис. 2, А). При прогнозе с 19-й к.н. (04.05–10.05) использована линейная аппроксимация убывающих по величине значений Rt (под № 3), которые проявили наименьшее соответствие фактических и ожидаемых значений. Причем хуже для принятия управленических решений, что в этом случае ожидаемые показатели значений Rt имеют меньшую величину, чем фактические, то есть происходит недооценка эпидемиологических рисков. Если учесть, что с 25-й к.н. (15.06–21.06) временной ряд значений Rt можно рассматривать как ста-

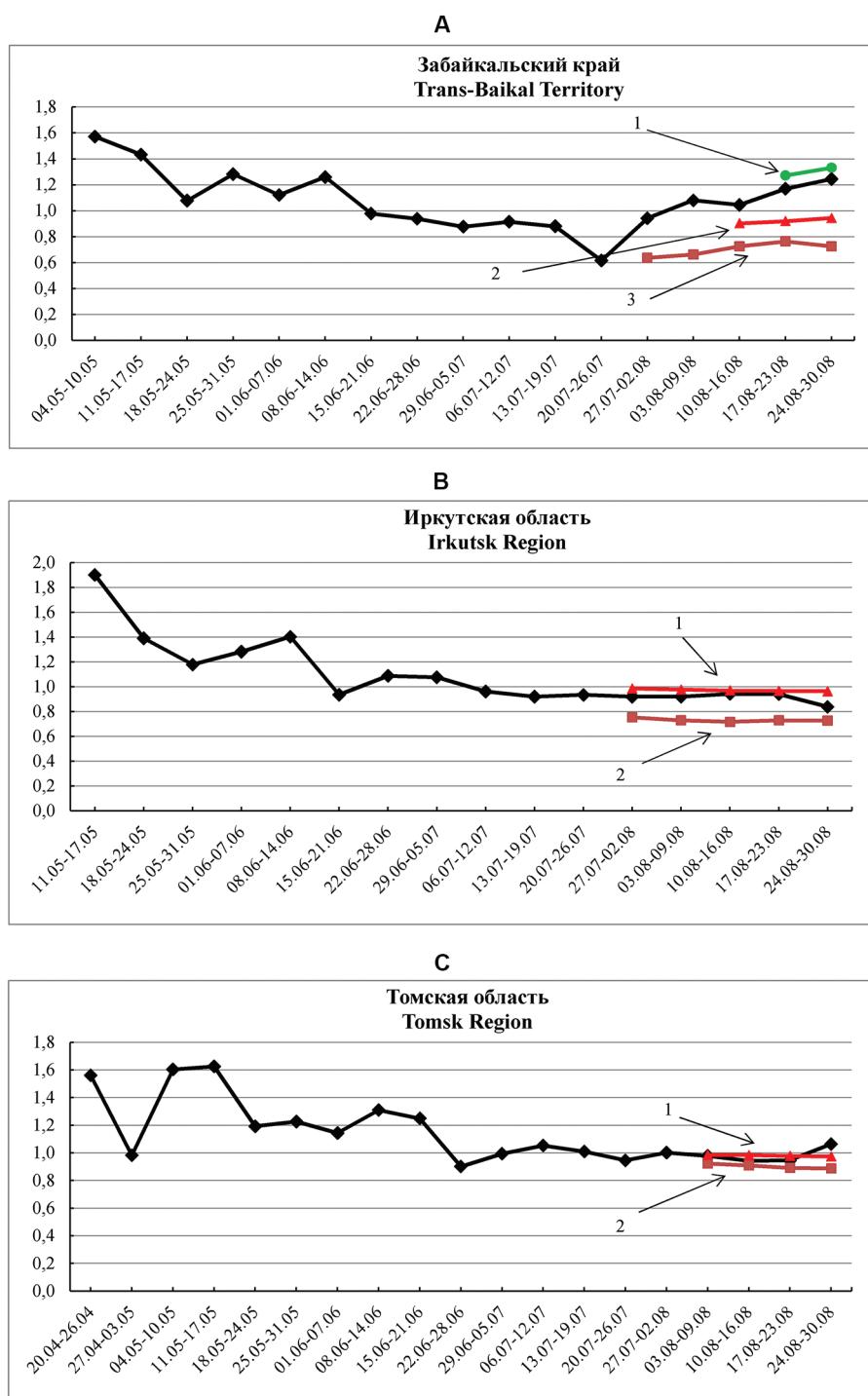


Рис. 2. Результаты прогноза коэффициента распространения инфекции (Rt) при использовании разных статистических моделей:

A. Забайкальский край: 1 – ожидаемые значения Rt при прогнозе с 30-й календарной недели (20.07–26.07) путем линейной экстраполяции статистически значимого тренда на повышение; 2 – ожидаемые значения Rt при прогнозе с 25-й календарной недели (15.06–21.06) по стационарному временному ряду; 3 – ожидаемые значения Rt при прогнозе с 19-й календарной недели (04.05–10.05) путем линейной экстраполяции статистически значимого тренда на понижение.

B. Иркутская область: 1 – ожидаемые значения Rt при анализе с 25-й календарной недели (15.06–21.06) по стационарному временному ряду; 2 – ожидаемые значения Rt при прогнозе с 20-й календарной недели (11.05–17.05) путем линейной экстраполяции статистически значимого тренда на понижение.

C. Томская область: 1 – ожидаемые значения Rt при прогнозе с 20-й календарной недели (11.05–17.05) путем линейной экстраполяции статистически значимого тренда на понижение; 2 – ожидаемые значения Rt при анализе с 26-й календарной недели (22.06–28.06) по стационарному временному ряду.

Fig. 2. The results of predicting infection spread rate (Rt) using various statistical models:

A. Trans-Baikal Territory: 1 – expected Rt values for the forecast covering the 30th calendar week (20.07–26.07) and further on by linear extrapolation of a statistically significant upward trend; 2 – expected Rt values for the forecast starting from the 25th calendar week (15.06–21.06) by a stationary time series; 3 – expected Rt values for the forecast starting from the 19th calendar week (04.05–10.05) by linear extrapolation of a statistically significant downward trend.

B. Irkutsk Region: 1 – expected Rt values when analyzing a stationary time series from the 25th calendar week (15.06–21.06); 2 – expected Rt values for the forecast from the 20th calendar week on (11.05–17.05) by linear extrapolation of a statistically significant downward trend.

C. Tomsk Region: 1 – expected Rt values when forecasting starting from the 20th calendar week (11.05–17.05) by linear extrapolation of a statistically significant downward trend; 2 – expected Rt values when analyzing a stationary time series from the 26th calendar week (22.06–28.06).

ционарный, соответствие теоретических и фактических данных становится гораздо лучше, несмотря на уменьшение числа наблюдений (под № 2). В настоящее время ретроспективно мы видим, что с 26-й к.н. (22.06–28.06) начал формироваться тренд на повышение значений R_t . Статистическую достоверность этой тенденции удалось доказать после получения материалов за 34-ю к.н. (17.08–23.08), то есть когда длина временного ряда составила всего пять значений. Соответственно, прогноз в ближайшей перспективе необходимо проводить по линейной аппроксимации данных за 20–34-ю и последующие недели (под № 1). В частности, для 35-й к.н. ожидаемое значение R_t по уравнению роста дало значение показателя, равное 1,33. Эта величина гораздо ближе к фактическому значению R_t (1,25), чем в случае продолжения расчетов по стационарному ряду (0,94).

Красноярский край (рис. 1.7). На отрезке с 13-й (23.03–29.03) по 21-ю к.н. (18.05–24.05) в ходе формирования эпидемического процесса его интенсивность резко менялась. Анализ графиков показывает, что характер процесса и соответственно подход к прогнозу значений R_t на отрезках 13–20-й и 21–35-й к.н. должен быть разным. Для прогноза взят фрагмент ряда с 21-й к.н. (18.05–24.05) до 35-й к.н. (24.08–30.08), который рассматривался как стационарный. Результаты прогноза для 33–34-й к.н. отражены в таблице, для 35-й к.н. – далее по тексту.

Иркутская область (рис. 1.8). Фрагмент ряда с 15-й к.н. (06.04–12.04) до 19-й к.н. (04.05–19.05) исключен из значений, учитываемых при прогнозе, так как в этот период эпидемический процесс еще формировался, в связи с чем наблюдались резкие перепады величины R_t . Временной ряд с 20-й к.н. (11.05–17.05) по 35-ю к.н. (24.08–30.08) содержит статистически достоверный ($P<0,01$) нисходящий тренд. Обусловлен он преимущественно значительным подъемом показателя заболеваемости коронавирусной инфекцией в первой декаде мая. С 25-й к.н. (15.06–21.06) во временном ряде экспертино выделен отрезок, отвечающий условиям стационарности. На рис. 2, В хорошо видно, что прогноз по тренду на 31–35-ю к.н. (под № 2) сильнее отличается от фактических данных, чем прогноз по более короткому стационарному ряду (под № 1). Последний подход использован нами в дальнейшем при расчете теоретически ожидаемых значений R_t на 33–34-ю к.н. (таблица) и для 35-й к.н. (по тексту).

Кемеровская область (рис. 1.9). Как и в большинстве рассмотренных выше субъектов, отрезок временного ряда, соответствующий началу формирования эпидемического процесса (16-я, 17-я к.н.), исключен из дальнейшего анализа. Временной ряд с 18-й к.н. (27.04–03.05) по 35-ю к.н. (24.08–30.08) рассматривается как стационарный с периодическими примерно одинаковыми по амплитуде колебаниями значений R_t . На его основе выполнен прогноз ожидаемых значений R_t на 33–34-ю к.н. (таблица) и для 35-й к.н. (далее по тексту).

Томская область (рис. 1.10). На отрезке с 17-й к.н. (20.04–26.04) по 20-ю к.н. (11.05–17.05) в ходе формирования эпидемического процесса его интенсивность резко менялась. Этот фрагмент не рассматривался при проведении прогноза. За период с 21-й к.н. (18.05–24.05) до 35-й к.н. (24.08–30.08) временного ряда значений R_t имеет достоверную тенденцию к снижению ($P<0,01$). Прогноз по тренду приведен на рис. 2, С (под № 2). Тем не менее начиная с 26-й к.н. (22.06–28.06) можно выделить фрагмент, соответствующий стационарному временному ряду. Несмотря на то, что временной ряд с 26-й к.н. короче, чем с 21-й к.н., прогноз по стационарному ряду на 32–35-ю к.н. (под № 1) дает лучшее приближение ожидаемых значений R_t к фактически наблюдаемым. Поэтому для расчетов теоретически ожидаемых значений R_t на 33–34-ю к.н. (таблица) и для 35-й к.н. (по тексту) использован стационарный временной ряд.

В таблице приведены результаты сравнения расчетных – ожидаемых значений R_t и фактических. Для 33-й (10.08–16.08) и 34-й к.н. (17.08–23.08) прогнозируемые значения существенно не отличаются от фактических данных по выборкам наблюдений, включающим десять субъектов РФ. К настоящему времени аналогичный анализ проведен для 35-й к.н. (24.08–30.08). И в этом случае ожидаемые значения соответствуют фактическим (значимо не отличаются): $t=0,66$; $P>0,05$. Тем самым доказаны низкие значения ошибок, полученные в ходе прогноза значений R_t .

Если ошибку прогноза рассчитать путем отнесения среднего значения разности фактических и ожидаемых значений R_t в субъектах к среднему уровню R_t , то ее величина колеблется от 3,2 до 4,8 %. Особое внимание при принятии управленческих решений по снятию/введению очередных этапов ограничительных мер следует обращать на случаи, когда фактическое значение R_t превышает верхнюю границу ДИ. Таких наблюдений при рассмотрении материалов из десяти субъектов за 33–35-ю к.н. (10.08–30.08) мы выявили шесть (20,0 %). Три из них приходятся на Забайкальский край, два – на Республику Бурятия, один – на Томскую область. Следовательно, наибольшее влияние на формирование смещенных прогнозов оказал Забайкальский край, в котором, как отмечено выше, за несколько последних недель рассматриваемого периода сформировался значимый тренд на рост показателя R_t (рис. 1.6 и рис. 2, А), что требует анализа причин этого явления. Кроме Забайкальского края фрагмент временного ряда с увеличивающимися значениями R_t выявлен в Республике Тыва (рис. 1.4).

Таким образом, прогноз, основанный на ретроспективном анализе временных рядов изменения R_t в десяти субъектах РФ, содержит малую величину отклонений фактических и ожидаемых значений, которые обычно лежат в границах 95 % ДИ. Большинство выявленных отклонений за границы ДИ связано с началом изменения интенсивности эпидемического

процесса (Забайкальский край), и сам факт их выявления является важным результатом проводимого анализа, позволяющим более рационально и оперативно планировать комплекс профилактических мероприятий COVID-19.

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

Список литературы

- WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID19, 11 March 2020. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (дата обращения 18.11.2020).
- Кутырев В.В., Попова А.Ю., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Сафонов В.А., Карнаухов И.Г., Иванова А.В., Щербакова С.А. Эпидемиологические особенности новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Сообщение 1: Модели реализации профилактических и противоэпидемических мероприятий. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:6–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-6-13.
- Adhikari S., Meng S., Wu Y., Mao Y., Ye R., Wang Q., Sun C., Sylvia S., Rozelle S., Raat H., Zhou H. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. *Infect. Dis. Poverty*. 2020; 9(1):29. DOI: 10.1186/s40249-020-00646-x.
- Updated information. [Электронный ресурс]. URL: <https://xn--80aesfpebagmfblc0a.xn--p1ai/> (дата обращения 16.08.2020).
- Букин Ю.С., Джисов Ю.П., Бондарюк А.Н., Ткачев С.Е., Злобин В.И. Применение универсальной математической модели эпидемического процесса «SRID» для прогноза развития эпидемии COVID-19 в городе Москва. *PREPRINTS.RU*. 2020. [Электронный ресурс]. DOI: 10.24108/preprints-3112045 (дата обращения 16.08.2020).
- Zhao S., Chen H. Modeling the epidemic dynamics and control of COVID-19 outbreak in China. *Quant. Biol.* 2020; 1–9. DOI: 10.1007/s40484-020-0199-0.
- Rong X., Yang L., Chu H., Fan M. Effect of delay in diagnosis on transmission of COVID-19. *Math. Biosci. Eng.* 2020; 17(3): 2725–40. DOI: 10.3934/mbe.2020149.
- 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.
- Блох А.И., Пеньевская 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.
- Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенченко Т.А., Плоскирева А.А., Дубоделов Д.В., Тивanova 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., Мамoshina М.В., Клушина 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.
- Кутырев В.В., Попова А.Ю., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Сафонов В.А., Карнаухов И.Г., Иванова А.В., Щербакова С.А. Эпидемиологические особенности новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Сообщение 2: особенности течения эпидемического процесса COVID-19 во взаимосвязи с проводимыми противоэпидемическими мероприятиями в мире и Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:6–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-6-12.
- 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., Пятнадцатникова А.Б., Брюхова Д.Д., Киселева Н.О., Гефан 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; 3:106–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-106-113.
- Елисеева И.И., Юзбашев М.М. Общая теория статистики: учебник. М.: Финансы и статистика; 2000. 480 с.
- Ивантер Э.В., Коросов А.В. Элементарная биометрия. Петропавловск: ПетрГУ; 2013. 110 с.
- Eliseeva I.I., Yuzbashev M.M. [General Theory of Statistics: Textbook]. Moscow: Finance and Statistics; 2000. 480 p.
- Ivanter E.V., Korosov A.V. [Elementary Biometry]. Petrozavodsk: Petrozavodsk State University, 2013. 110 p.

References

- WHO. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID19, 11 March 2020. (Cited 18 Nov 2020). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.

- Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Smolensky V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Y.V., Safronov V.A., Karnaughov I.G., Ivanova A.V., Shcherbakova S.A. [Epidemiological features of new coronavirus infection (COVID-19). Communication 1: Modes of implementation of preventive and anti-epidemic measures]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):6–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-6-13.

- Adhikari S., Meng S., Wu Y., Mao Y., Ye R., Wang Q., Sun C., Sylvia S., Rozelle S., Raat H., Zhou H. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. *Infect. Dis. Poverty*. 2020; 9(1):29. DOI: 10.1186/s40249-020-00646-x.

- Updated information. (Cited 16 Aug 2020). [Internet]. Available from: <https://xn--80aesfpebagmfblc0a.xn--p1ai/>

- Bukin Yu.S., Dzhioev Yu.P., Bondaryuk A.N., Tkachev S.E., Zlobin V.I. [Application of the universal mathematical model of the epidemic process "SRID" for forecasting the development of the COVID-19 epidemic in Moscow]. *PREPRINTS.RU*. 2020. (Cited 16 Aug 2020). [Internet]. Available from: <https://doi.org/10.24108/preprints-3112045>.

- Zhao S., Chen H. Modeling the epidemic dynamics and control of COVID-19 outbreak in China. *Quant. Biol.* 2020; 1–9. DOI: 10.1007/s40484-020-0199-0.

- Rong X., Yang L., Chu H., Fan M. Effect of delay in diagnosis on transmission of COVID-19. *Math. Biosci. Eng.* 2020; 17(3): 2725–40. DOI: 10.3934/mbe.2020149.

- 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.

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

- Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenchenko 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. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-27-35.

- Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Smolensky V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Safronov V.A., Karnaughov I.G., Ivanova A.V., Shcherbakova S.A. [Epidemiological peculiarities of new coronavirus infection (COVID-2019). Communication 2: Peculiarities of epidemic process development in conjunction with performed anti-epidemic measures around the world and in the Russian Federation]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):6–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-6-12.

- 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):106–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-106-113.

- Eliseeva I.I., Yuzbashev M.M. [General Theory of Statistics: Textbook]. Moscow: Finance and Statistics; 2000. 480 p.

- Ivanter E.V., Korosov A.V. [Elementary Biometry]. Petrozavodsk: Petrozavodsk State University, 2013. 110 p.

Authors:

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

Об авторах:

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

**А.Г. Полтавченко, А.В. Ерш, П.В. Филатов, Н.Д. Ушканенко, С.Н. Якубецкий,
Ал.А. Сергеев, Д.Н. Щербаков**

УСКОРЕННЫЙ СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ОРТОПОКСВИРУСОВ

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Российской Федерации

Цель – разработка чувствительного и быстрого иммунохимического теста для выявления ортопоксвирусов (ОПВ) во внелабораторных условиях. **Материалы и методы.** В культуральных неочищенных и очищенных препаратах вирусов осповакцины, эктромелии, оспы коров и кроликов, а также в крови и супензиях тканей инфицированных мышей и кроликов выявляли ортопоксвирусный антиген в одностадийном и двустадийном вариантах дот-иммуноанализа на основе плоских белковых матриц с использованием кроличьих поликлональных антител в качестве реагентов захвата и детекции. **Результаты и обсуждение.** Показано, что чувствительность обнаружения ОПВ обратно пропорциональна степени их очистки. Одностадийный (ускоренный) вариант анализа специфичен и позволяет в течение 39 минут выявлять ОПВ в неочищенных культуральных образцах вируса и клинических пробах в диапазоне 10^4 – 10^3 БОЕ/мл. Ускоренный дот-иммуноанализ может использоваться для выявления или исключения присутствия вирусной угрозы в образцах и быть полезен в различных аспектах обеспечения биологической безопасности. Простота выполнения анализа, возможность визуального учета и несложная интерпретация результатов позволяют использовать тест во внелабораторных условиях.

Ключевые слова: ортопоксвирусы, быстрое выявление, плоские белковые матрицы, дот-иммуноанализ, полевые условия.

Корреспондирующий автор: Полтавченко Александр Георгиевич, e-mail: poltav@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Филатов П.В., Ушканенко Н.Д., Якубецкий С.Н., Сергеев Ал.А., Щербаков Д.Н. Ускоренный способ выявления ортопоксвирусов. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 3:106–113. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-106-113.

Поступила 14.09.2020. Отправлена на доработку 09.12.2021. Принята к публ. 22.01.2021.

**A.G. Poltavchenko, A.V. Ersh, P.V. Filatov, N.D. Ushkalenko, S.N. Yakubitsky, Al. A. Sergeev,
D.N. Shcherbakov**

Rapid Detection of Orthopoxviruses

State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to develop a sensitive and fast immunochemical test for the detection of orthopoxviruses (OPXV) in the “point of care” format. **Materials and methods.** The analyses were performed in cultured crude and purified preparations of vaccinia virus, cowpoxvirus, rabbitpoxvirus and ectromelia virus, as well as in the blood and tissue suspensions of infected mice and rabbits. OPXV-antigen was detected by one-stage and two-stage protocols of dot-immunoassay based on flat protein arrays using rabbit polyclonal antibodies as capture and detection reagents. **Results and discussion.** The results show that the detection limit of OPXV is inversely related to the degree of their purification. The one-stage (rapid) protocol is specific and allows detecting OPXV in crude culture samples of the virus and in clinical samples in the range of 10^4 – 10^3 PFU/ml within 39 minutes. Rapid dot-immunoassay can be applied to detect or exclude the presence of a viral threat in samples and can be useful in various aspects of biosafety provision. The simplicity of the one-stage protocol, the possibility to visually account the results and easy interpretation of the results allow the rapid test to be used in the “point of care” format.

Key words: orthopoxviruses, rapid detection, flat protein arrays, dot-immunoassay, field condition.

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

Corresponding author: Alexandre G. Poltavchenko, e-mail: poltav@vector.nsc.ru.

Citation: Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Filatov P.V., Ushkalenko N.D., Yakubitsky S.N., Sergeev Al. A., Shcherbakov D.N. Rapid Detection of Orthopoxviruses.

Проблемы особо опасных инфекций [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2021; 3: 106–113. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-106-113.

Received 14.09.2021. Revised 09.12.2021. Accepted 22.01.2021.

Poltavchenko A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>
Ersh A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9220-1250>
Filatov P.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7763-3808>

Yakubitsky S.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0496-390X>
Sergeev Al.A., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8355-5551>
Shcherbakov D.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>

Род *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* объединяет крупные и сложные ДНК-содержащие вирусы, способные инфицировать людей и вызывать у них тяжелые контагиозные заболевания [1]. В связи с успешной ликвидацией оспы массовая вакцинация против нее прекращена в 1980 г. В то же время возможность применения вируса натуральной оспы в террористических или военных целях [2, 3], а также зоонозные инфекции, вызываемые вирусом

оспы обезьян (ВОО), вирусом оспы коров (ВОК) и вирусом осповакцины (ВОВ), представляют угрозу для невакцинированного населения [4]. В последнее время случаи заражения ВОО в Центральной Африке [5–7] и США [8], ВОК в Европе [9] и ВОВ в Бразилии [10, 11] подчеркивают эпидемический потенциал этих вирусов.

Раннее выявление заболеваний, вызываемых ортопоксвирусами (ОПВ), важно для оперативно-

го принятия обоснованных решений относительно изоляции и лечения пациентов, а также определения эпидемиологии заболевания и осуществления мер по его контролю [12]. Быстрое и надежное обнаружение инфекционных агентов при отсутствии хорошо оснащенной лабораторной инфраструктуры является сложной задачей. Идеальная диагностическая система для анализа в полевых условиях должна быть чувствительной и специфичной, достаточно простой в применении с использованием разных типов образцов, быстрой и надежной, не нуждаться в энергообеспечении и сложном оборудовании, обладать компактностью и физической прочностью, быть доступной по стоимости [13, 14].

Диагноз ОПВ-инфекции не может быть поставлен только по клиническим признакам, поскольку сходные симптомы характерны и для ряда других заболеваний. Дифференциальная диагностика может быть проведена лабораторными методами с применением: электронной микроскопии (выявление вирусных частиц), полимеразной цепной реакции (выявление вирусной ДНК) или иммунохимических тестов (выявление вирусных белков). Электронная микроскопия может быть выполнена быстро, но чувствительность ее невелика. Анализы полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (OT-ПЦР) позволяют в течение нескольких часов выявлять десятки и даже сотни [15] копий вирусной ДНК и дифференцировать виды ОПВ, однако такой анализ может выполняться в строго контролируемых лабораторных условиях [16]. Иммунохимические методы менее чувствительны, чем ПЦР. Так, лабораторный иммуноферментный анализ (ИФА) с парой тщательно подобранных моноклональных антител позволяет обнаруживать ОПВ при вирусной нагрузке выше $1 \cdot 10^3$ БОЕ/мл [17]. С другой стороны, иммунохимические тесты менее прихотливы к условиям анализа и могут выполняться существенно быстрее ПЦР. Так, известен коммерчески доступный иммунохроматографический (lateral flow immunoassay) тест Orthopox BioThreat® Alert, допускающий выявление ОПВ в концентрациях 10^6 – 10^7 БОЕ/мл в течение 20–25 мин [12]. Другим примером может служить немецкая иммунофильтрационная система ABICAP (Antibody Immuno Column for Analytical Processes), позволяющая в течение 45 мин достоверно выявить ОПВ при их содержании в образце, превышающем 10^4 БОЕ/мл [16]. Оба теста могут выполняться во внелабораторных условиях, однако уступают в чувствительности лабораторному ИФА.

Ранее мы сообщали о разработке быстрого и простого в применении иммунохимического теста на основе плоских белковых матриц, пригодного для выявления вируса осповакцины во внелабораторных условиях, а также позволяющего сократить время анализа и повысить чувствительность определения вируса осповакцины в неочищенных культуральных препаратах [18].

Целью настоящей работы являются лаборатор-

ные испытания теста с использованием более широкого круга ОПВ и клинических образцов.

Материалы и методы

Вирусные препараты: ВОВ (ЛИВП) – вирус осповакцины штамм 14 ЛИВП; ВОВ (ABCNJ) – рекомбинантный штамм ВОВ; ВОВ_A34R_[D110N_K151E] – вирус осповакцины с аминокислотными заменами D110N, K151E в мембранном гликопротеине A34; ВЭ – вирус электромелии штамм К-1; ВОК – вирус оспы коров штамм GRI-90; ВОКр – вирус оспы кроликов штамм Уtrecht.

Культивирование и выделение вирусов. Монослой клеточной культуры линии CV-1, выращенный в культуральных флаконах с ростовой площадью 75 см², инфицировали определенным вирусом, инкубировали в поддерживающей питательной среде (DMEM/F-12 (1:1) с 2 % эмбриональной сыворотки коров, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 МЕ/мл пенициллина) в течение 72 ч при температуре 37 °C до полного цитопатического действия. Затем получали криолизат инфицированных клеток (два цикла замораживания-оттаивания), из которого отбирали *образец 1*, остальную часть криолизата обрабатывали на ультразвуковом дезинтеграторе два раза по 10 сек при мощности 20 кГц, из которой отбирали *образец 2*. Оставшуюся часть криолизата делили на две части, одну из которых центрифugировали при 5000 об/мин в течение 15 мин при 4 °C, и осадок отбирали как *образец 3*. Другую часть криолизата центрифугировали при 14000 об/мин в течение 2 ч при 4 °C с использованием «подушки» из 30 % сахараозы, и очищенный от клеточного дебриса вирус отбирали из нижней части пробирки как *образец 4*. Инфекционный титр вирусов определяли безагаровым методом бляшек на культуре клеток 4647.

Антитела. а/POX-IgG – IgG из гипериммунной по ВОВ сыворотки кролика. Гипериммунную сыворотку против общих белков вируса получали путем иммунизации кроликов шиншиллы очищенным штаммом ЛИВП вируса осповакцины. Животных иммунизировали три раза с интервалом 28 дней. Первая иммунизация проводилась в дозе $8,2 \cdot 10^6$ БОЕ/животное внутрекожно в двух местах. Вторая иммунизация проводилась в дозе $1,2 \cdot 10^8$ БОЕ/животное с использованием полного адьюванта Фрейнда в соотношении 1:1 подкожно в десять мест. Третья иммунизация проведена аналогично второй, но с использованием неполного адьюванта Фрейнда. Кровь отбирали через 28 дней после третьей иммунизации, и сыворотку отделяли путем образования и ретракции фибринового сгустка. IgG из иммунной сыворотки кролика (а/POX-IgG) выделяли осаждением сульфатом аммония и хранили при -18 °C. IgG НКС – IgG из нормальной сыворотки кролика, выделенные методом осаждения сульфатом аммония, хранение при -18 °C.

Клинические материалы. В качестве клинических материалов использовали образцы крови и

органов кролика, инфицированного интраназально вирусом ВОКр в дозе 10^4 БОЕ, и образцы органов мышей линии BALB/c, интраназально инфицированных ВОВ (ЛИВП)-4 в дозах 10^6 – 10^8 БОЕ/30 мкл/животное. Подробности получения и подготовки проб приведены в тексте. Исследования и манипуляции на животных одобрены комитетом по биоэтике ГНЦ ВБ «Вектор» и выполнялись согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [19].

Отпавшая корочка с места вакцинации пациента получена из МСЧ 163 в виде обезличенного образца.

Контрольные образцы. В качестве гетерогенных контролей использовали антигены вирусов, вызывающих экзантематозные заболевания: **антиген вируса кори**, вирус кори (штамм НовО/96) культивировали на монослое клеток Vero, выделяли и концентрировали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы, и инактивировали вирусную активность прогреванием в течение 1 ч при 56°C ; **антиген вируса краснухи** (композиция рекомбинантных белков E1, E2 и C) закупали у фирмы «Капель» (Москва, Россия); **антиген вируса ветряной оспы** (Varicella native antigen кат. № FPZ0039) закупали у фирмы Fapon Inc. (Китай). Все гетерогенные контроли использовали в концентрации 1 мкг/мл. Кроме того, в качестве контрольных материалов использовали пробы культуры клеток CV-1, обработанные в соответствии с протоколами подготовки образцов 1, 2 и 3.

Иммунозоль Au-a/POX-IgG. Золь золота (15–20 нм) получали путем восстановления раствора тетрахлорзолотой кислоты цитратом натрия при 100°C . Коагуляционный тест для определения дозы нагрузки золя антителами а/POX-IgG и саму нагрузку проводили, как описано ранее [20]. Дополнительную стабилизацию золя выполняли добавлением БСА до 1 %. Очистку иммунозоля проводили центрифугированием при 14000 г в течение 35 мин при 4°C .

Набор для выявления ОПВ включал в себя белковые матрицы, аналитические ванны, перфоратор для вскрытия фольги над ячейками ванны, флаконы с дважды дистиллированной водой и 0,4 % раствором нитрата серебра. Основные элементы набора, приемы изготовления белковых матриц и подготовки аналитических ванн подробно описаны в предыдущей работе [18].

При изготовлении белковых матриц рабочие разведения реагентов захвата на 5 мМ боратном буферном растворе (рН 6,0) аликвотами по 2,5 мкл дискретно наносили на рабочую сторону [21] подложки из синтетической бумаги на основе поливинилхлорида (Pentaprint марки PR-M180/09-07/9400, Klöckner Pentoplast, Германия), высушивали в течение 2 ч при 45°C ; блокировали погружением на 2 ч в 0,01 М фосфатном буферном растворе (рН 7,4), содержащем 0,2 % казеина; тщательно просушивали и использовали в работе.

Аналитическая ванна из полипропилена объединяет 5 модулей из 12 ячеек, каждый из которых предназначен для выполнения одного анализа. Ванна заполнена рабочими растворами, за исключением ячеек девятого ряда, содержащих по таблетке (4 мг) сухого компонента физического проявителя (смесь метола и лимонной кислоты в соотношении 2:5). Заполненные ванны термически герметизированы укрывным материалом Colflex (Al Pak, Словения). До использования ванны хранили при 4°C .

Дот-иммуноанализ выполняли при температуре выше 20°C . Перед анализом вскрывали фольгу над ячейками ванны перфоратором и вносили в ячейки девятого ряда по 200 мкл бидистиллированной воды (для растворения сухого компонента проявителя).

В рутинной (двустадийной) постановке в первый ряд ячеек ванны вносили по 15 мкл исследуемых образцов (рабочее разведение 1:20), погружали в них белковые матрицы и инкубировали 25 мин, а затем с определенными интервалами перемещали по следующим рядам. Непосредственно перед погружением матриц в ячейки девятого ряда в них вносили по 200 мкл 0,4 % раствора нитрата серебра. После выемки из последнего ряда ячеек матрицы подсушивали на воздухе и визуально учитывали результаты. Общее время выполнения рутинного анализа – 66 мин. Положительным считали образец, формирующий ясно различимое темное пятно в тестовой зоне белковой матрицы при интенсивном окрашивании зоны положительного контроля и отсутствии окраски в зоне отрицательного контроля.

В ускоренной (одностадийной) постановке исследуемые образцы (15 мкл) вносили в четвертый ряд ванны, заполненный рабочим раствором коньюгата, инкубировали матрицы 25 мин в полученной смеси и далее выполняли отмытки, проявление и учет результатов так, как описано для рутинного метода. Время выполнения ускоренного анализа – 39 мин. Схемы рутинного и ускоренного анализов представлены в предыдущей работе [18].

Предел обнаружения вирусов рассчитывали как результат умножения исходного титра образца вируса на максимальное разведение, при котором контрольная точка четко определялась визуально. Все эксперименты проводились в нескольких повторах и показали одинаковый предел обнаружения. Поскольку измерения не были количественными, статистическая обработка результатов не проводилась.

Результаты и обсуждение

В предыдущей работе мы сравнивали эффективность выявления ВОВ в рутинном и ускоренном вариантах дот-анализа. Сокращение времени выполнения ускоренного варианта анализа достигается за счет совмещения стадий инкубации белковых матриц в образце и коньюгате и сокращения числа отмыток. В отличие от описанных ранее вариантов

иммунохимического анализа [12, 16, 17], использующих пары моноклональных антител против разных антигенных детерминант ОПВ, наш ускоренный метод основан на применении поликлональных антител против ВОВ как в качестве иммобилизованного на подложке реагента захвата, так и в качестве связанных с частицами коллоидного золота антител детекции. Ранее установлено [18], что лимит определения ВОВ имеет обратную зависимость от степени очистки препаратов от субвирусных структур; а одностадийный вариант дот-иммуноанализа, наряду с сокращением времени анализа, позволяет увеличить чувствительность выявления ВОВ в неочищенных вирусных препаратах. В настоящей работе мы продолжили это исследование с использованием более широкого круга препаратов ортопоксвирусов (в том числе генетически измененных вариантов ВОВ) с разной степенью очистки. Результаты исследования приведены в табл. 1.

Данные табл. 1 подтверждают, что ускоренный вариант дот-анализа со всеми препаратами вирусов обеспечивает чувствительность, как минимум в два раза превышающую чувствительность двустадийного анализа. Как было показано ранее, такой прирост чувствительности может быть объяснен образованием крупных агрегатов частиц иммунозоля на поверхности субвирусных структур, значительно усиливших оптический сигнал при проявлении результатов анализа [18]. Обработка культуральных вирусов ультразвуком во всех образцах 2 снижает чувствительность выявления, вероятно, вследствие разрушения конформационных эпигенетиков, расположенных на поверхности субвирусных структур, а также повышения дисперсности клеточного дебриса, ограничивающего диффузию и контакты вирусных антигенов с антителами захвата на подложке.

Оба варианта постановки анализа специфичны и не обнаруживают взаимодействий с препаратами

Таблица 1 / Table 1

Чувствительность выявления препаратов ортопоксвирусов в разных вариантах условий постановки дот-иммуноанализа

Sensitivity of orthopoxvirus detecting under different conditions of dot-immunoassay layout

Образец (штамм) Sample (strain)	Тип образца Type of sample	Исходный титр, БОЕ/мл Initial titer, PFU/ml	Лимит определения в дот-иммуноанализе Detection threshold in dot-immunoassay			
			рутинный анализ routine analysis		ускоренный анализ rapid analysis	
			развед. dilution	титр, БОЕ/мл titer, PFU/ml	развед. dilution	титр, БОЕ/мл titer, PFU/ml
BOB (ABCNJ) Vaccinia virus (ABCNJ)	3	6,9·10 ⁸	1/1600	4,3·10 ⁵	1/6400	1,1·10 ⁵
	4	4,0·10 ⁸	1/800	5,0·10 ⁵	1/3200	1,2·10 ⁵
BOB (_A34R_[D110N_K151E]) Vaccinia virus (_A34R_[D110N_K151E])	1	1,1·10 ⁶	1/800	1,4·10 ³	1/800	1,4·10 ³
	1	1,1·10 ⁷	1/1600	7,2·10 ³	1/3200	3,6·10 ³
BOB (ЛИВП) Vaccinia virus (LIVP)	2	3,6·10 ⁷	1/1600	2,2·10 ⁴	1/3200	1,1·10 ⁴
	3	8,5·10 ⁶	1/3200	2,6·10 ³	1/12800	6,6·10 ²
	4	3,0·10 ⁸	1/800	6,2·10 ⁵	1/1600	1,9·10 ⁵
	1	2,3·10 ⁶	1/200	1,1·10 ⁴	1/800	2,8·10 ³
ВЭ (К-1) ectromelia virus(K-1)	2	1,9·10 ⁷	1/100	1,9·10 ⁵	1/400	4,8·10 ⁴
	3	8,5·10 ⁶	1/100	8,4·10 ⁴	1/400	2,1·10 ⁴
	4	2,2·10 ⁸	1/400	5,5·10 ⁵	1/800	2,8·10 ⁵
	1	9,8·10 ⁶	1/200	4,8·10 ⁴	1/800	1,2·10 ⁴
BOK (GRI-90) Cowpox virus (GRI-90)	2	3,0·10 ⁷	1/200	1,5·10 ⁵	1/800	3,8·10 ⁴
	3	1,3·10 ⁷	1/200	6,4·10 ⁴	1/800	1,6·10 ⁴
	4	4,0·10 ⁸	1/800	5,0·10 ⁵	1/1600	2,5·10 ⁵
	1	1,0·10 ⁶	1/800	1,2·10 ³	1/1600	6,2·10 ²
Контроль клеточной культуры* Cell culture control*	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
Гетерогенный контроль** Heterogenic control**	Ветряная оспа Chicken-pox	0	0	0	0	0
	Корь Measles	0	0	0	0	0
	Краснуха Rubella	0	0	0	0	0

Примечание: типы образцов: 1 – криолизат инфицированных клеток (два цикла замораживания – оттаивания); 2 – образец 1, обработанный ультразвуком (2 раза по 10 с при 20 кГц); 3 – супернатант после центрифугирования образца 2 (5000 об/мин, 15 мин, 4 °C); 4 – нижняя фракция после центрифугирования образца 3 с сахарозной подушкой (14000 об/мин, 2 ч, 4 °C). * Для контроля использованы неинфицированные клетки, обработанные как образцы 1–3. ** Гетерогенные контроли описаны в «Материалах и методах».

Note: types of samples: 1 – cryolysate of infected cells (two cycles of freezing – thawing); 2 – sample 1, treated with ultrasound (2 times for 10 s at 20 kHz); 3 – supernatant after centrifugation of sample 2 (5000 rpm, 15 min, 4 °C); 4 – lower fraction after centrifugation of sample 3 with a sucrose pad (14000 rpm, 2 h, 4 °C). * Uninfected cells treated as samples 1–3 were used for control. ** Heterogeneous controls are described in the “Materials and Methods”, section.

незараженной клеточной культуры, обработанной в соответствии с протоколами подготовки вирусных образцов 1–3, и с гетерогенными контролями возбудителей экзантематозных инфекций (корь, краснуха, ветряная оспа). С учетом возможных погрешностей в титровании вируса и постановке дот-анализа чувствительность ускоренного варианта выявления ортопоксвирусов в неочищенных препаратах можно обозначить диапазоном 10^3 – 10^4 БОЕ/мл.

Для оценки выявления ортопоксвирусов в клинических материалах использовали 6-месячного кролика породы шиншилла массой 2,0–2,5 кг, полученного из питомника лабораторных животных ГНЦ ВБ «Вектор» и интраназально инфицированного вирусом ВОКр в дозе 10^4 БОЕ. Наблюдение за инфицированным кроликом осуществляли в течение семи суток с момента заражения до гибели животного. Наблюдаемые клинические признаки заболевания приведены в табл. 2.

В течение всего инфекционного периода ежедневно из ушной вены отбирали по 3 мл крови и после образования сгустка разделяли каждую пробу на сыворотку и форменные элементы. Из сгустка форменных элементов готовили 10 % суспензию на физиологическом растворе. Полученные образцы исследовали ускоренным дот-анализом. После гибели кролика его вскрывали и отбирали образцы массой 0,1–0,2 г из разных участков почек, печени, легких и селезенки, а также кусочков ($0,5 \text{ см}^2$) кожи из зоны с видимыми высыпаниями. Отбор образцов и получение из них суспензий проводили в соответствии с методическими указаниями «Лабораторная диагностика натуральной оспы. Методические указания МУ 1.3.2970–11» (М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012). Полученные гомогенаты в объеме 30 мкл вносили в ячейки четвертого ряда аналитической ванны и выполняли ускоренный дот-анализ. Результаты исследований приведены на рис. 1.

На рис. 1, Б видно, что в сыворотке крови инфицированного животного вирус обнаруживается

Таблица 2 / Table 2
Клинические признаки заболевания кролика
после интраназального заражения ВОКр

Clinical signs of the disease in rabbits after intranasal inoculation with rabbit poxvirus

Сутки после заражения 24 hours after inoculation	Внешние клинические признаки заболевания External clinical signs of the disease	Температура тела, °C Body temperature, °C
0	Нет/No	39,2
1	Нет/No	39,4
2	Нет/No	39,3
3	Нет/No	39,4
4	Нет/No	39,7
5	Нет/No	40,2
6	Тремор, ринит Tremor, rhinitis	40,6
7	Папулы на коже, гибель Skin papules, death	—

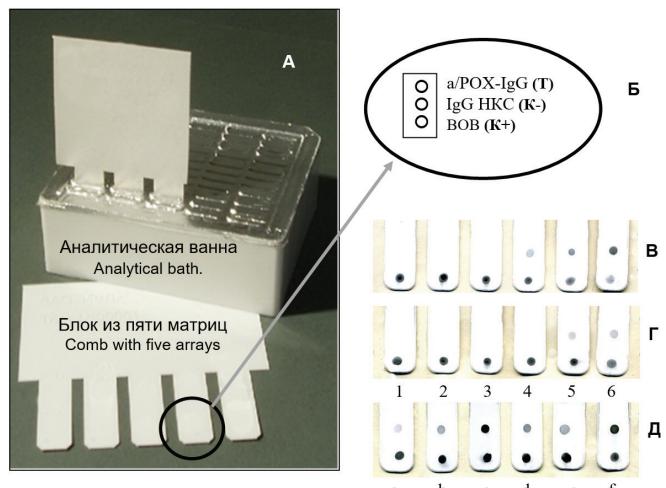


Рис. 1. Результаты ускоренного анализа образцов от инфицированного кролика:

А – схема размещения реагентов захвата на матрице (Т – тестовая зона, К- и К+ – зоны отрицательного и положительного контроля соответственно). Вид белковых матриц после исследования: Б – сыворотки крови; В – форменные элементы крови (цифрами под матрицами обозначены дни с момента заражения); Г – гомогенаты образцов: почки (а), селезенки (б), легкого (в), печени (г), участков кожи с папулезными высыпаниями (д, е)

Fig. 1. Results of the rapid analysis of samples from an infected rabbit:

А – layout of capture reagents on the array (T – test zone, K- and K+ – zones of negative and positive control, respectively). Type of protein matrices after investigation: B – blood sera; C – formed elements of blood (the numbers under the matrices indicate the days from the moment of infection); D – homogenates of samples: kidney (a), spleen (b), lung (c), liver (d), areas of skin with papular eruptions (e, f)

с четвертого дня после заражения, что совпадает с повышением температуры тела (см. табл. 2), и содержание его резко возрастает в последующие дни до гибели кролика. На очень высокие титры вируса в крови на пятые и шестые сутки указывает снижение интенсивности окраски зоны К+ на матрице (так называемый хук-эффект), свидетельствующее о том, что коньюгат в процессе анализа в основном связывается с вирусами в жидкой фазе, что приводит к дефициту иммунозоля, реагирующего с антигеном в контрольной точке на поверхности матрицы. Ранее мы отмечали такой эффект при анализе ВОВ с титром, превышающим 10^5 БОЕ/мл (неопубликованные данные). В форменных элементах крови антигены вируса выявляются на сутки позднее (см. рис. 1, В).

На рис. 1, Г видно, что вирус обнаруживается во всех исследованных органах погибшего животного. По результатам анализа распределение концентрации ВОКр в органах кролика по убыванию (легкие, печень, селезенка, почка), хотя такой эффект может быть вызван разной способностью тканей к экстракции вируса, а реальное распределение может быть иным. В кожных высыпаниях (папулах) содержатся высокие концентрации вируса (образцы д и е). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными [22].

Другим источником клинических материалов служили органы мышей линии BALB/c с массой тела 13–16 г, интраназально инфицированных ВОВ

Таблица 3 / Table 3

Характеристики исследованных клинических образцов от мышей
Characteristics of the investigated clinical samples from mice

№ образца Sample No	Инфицирующая доза Infective Dose	Орган Organ	Титр, БОЕ/мл Titer, PFU/ml
1	10^8 БОЕ/животное 10^8 PFU/animal	Носовая перегородка со слизистой / Nasal septum with mucous membrane	$1,8 \cdot 10^7$
2		Легкие / Lungs	$1,8 \cdot 10^6$
3		Головной мозг / Brain	$9,1 \cdot 10^4$
4	10^6 БОЕ/животное 10^6 PFU/animal	Носовая перегородка со слизистой / Nasal septum with mucous membrane	$4,0 \cdot 10^3$
5		Печень / Liver	10
6		Селезенка / Spleen	80
7	0	Селезенка / Spleen	0
8		Головной мозг / Brain	0
9		Легкие / Lungs	0

(ЛИВП)-4 в дозах 10^6 и 10^8 БОЕ/животное. Контролем служили органы здоровых мышей. Забор проб органов осуществляли на седьмые сутки после инфицирования, после процедуры эвтаназии с помощью цервикальной дислокации. Для исследования из проб готовили 10 % суспензии путем механической дезинтеграции с помощью стальных шаров и гомогенезатора с последующим добавлением питательной среды ДМЕМ. После нескольких актов замораживания-оттаивания полученных тканевых гомогенатов в них определяли титры вирусов методом бляшек на культуре клеток CV-1. Характеристики предоставленных образцов приведены в табл. 3, а результаты их ускоренного дот-анализа – на рис. 2.

На рис. 2 видно, что вирусы надежно определяются в органах мыши, зараженной высокой дозой вируса. При низкой дозе инфицирования вирус на пределе чувствительности выявляется в слизистой носа. Таким образом, надежное тестирование вируса в гомогенатах органов возможно при их содержании около 10^4 БОЕ/мл.

Из клинических материалов человека исследователи располагали корочкой с пустулой на месте вакцинации (массой 0,2 г), отправившей на 29-е сутки после введения осповакцины. Корочка была полу-

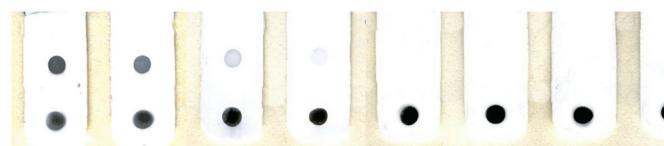


Рис. 2. Вид белковых матриц после ускоренного анализа гомогенатов проб органов мыши. Характеристики образцов приведены в табл. 3

Fig. 2. View of protein arrays after rapid analysis of homogenates of mouse organ samples. The characteristics of the samples are given in table 3

чена из МСЧ 163 в виде обезличенного образца. Высушеннную корочку растирали в фарфоровой ступке и суспендировали в 1 мл физиологического раствора. Ориентировочную оценку концентрации ВОВ в суспензии из корочки выполняли путем параллельного титрования этой суспензии и препарата ВОВ (ЛИВП)-3. Из суспензии корочки и препарата ВОВ (ЛИВП)-3 с известным биологическим титром ($8,5 \cdot 10^6$ БОЕ/мл) готовили серии двукратных разведений на РБРК и выполняли с ними ускоренный дот-анализ. Результаты оценки приведены на рис. 3.

Видно, что по интенсивности окраски пятен в тестовой зоне и по максимальному разведению, в котором образцы дают положительный оптический сигнал, препарат из корочки на порядок отстает от вирусного материала. Следовательно, концентрация вируса в суспензии из корочки ориентировано в 10 раз меньше, чем в исходном препарате ВОВ (ЛИВП)-3 и составляет около 10^6 БОЕ/мл, а лимит выявления, соответственно, около $5 \cdot 10^3$ БОЕ/мл.

Таким образом, ускоренный вариант дот-иммуноанализа позволяет обнаруживать ОПВ в неочищенных вирусных образцах и клинических пробах в диапазоне 10^3 – 10^4 БОЕ/мл в течение 39 минут. Эта чувствительность немного ниже лимита обнаружения для ИФА с использованием тщательно подобранных пар моноклональных антител [17], но превышает чувствительность известных систем для внелабораторной (point of care) детекции ОПВ [12, 16]. Существенным преимуществом описанного выше теста является то, что он изготовлен с использованием одного вида поликлональных антител и в качестве реагента захвата, и в качестве реагента

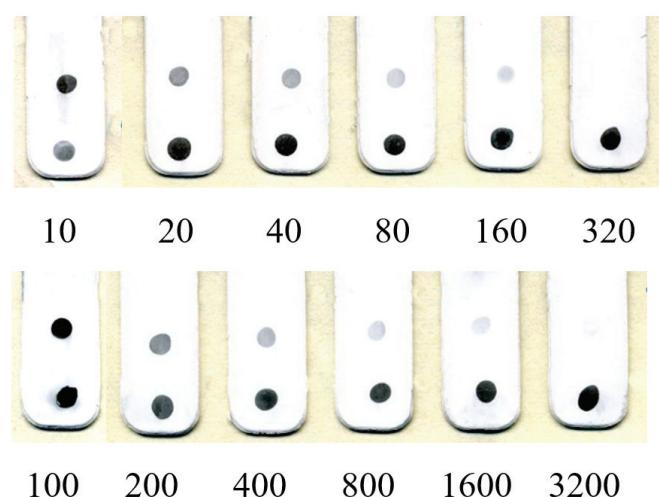


Рис. 3. Сравнительный анализ серий разведений суспензии из корочки с пустулой на месте вакцинации, отпавшей на 29-е сутки после введения осповакцины (верхний ряд) и препарата ВОВ (ЛИВП)-3 (нижний ряд). Цифрами под матрицами указаны кратность разведений

Fig. 3. Comparative analysis of dilution series of suspension from a crust from a pustule at the site of vaccination, which fell away on day 29 after the administration of vaccinia (upper row) and vaccinia virus (LIVP)-3 (lower row). The numbers under the matrices indicate the multiplicity of dilutions

детекции, что значительно упрощает и снижает стоимость производства диагностической системы [23]. Хотя в настоящем исследовании протестированы только несколько штаммов ОПВ, известно, что они обладают широкой перекрестной антигенной реактивностью [24], и результаты должны быть сходными для всех ОПВ, в том числе и высокопатогенных для человека.

Описанный выше ускоренный дот-иммуноанализ является чувствительным, специфичным, относительно быстрым, простым в исполнении и недорогим тестом, позволяющим выявлять ОПВ в вирусных и клинических материалах. Результаты теста считаются визуально без необходимости дополнительного оборудования и просты для интерпретации, что важно при выполнении анализов в соответствии с протоколами биоконтроля BSL 3 или BSL 4. Этот способ анализа применим во внелабораторных условиях и может быть полезен при обнаружении вирусной угрозы в различных приложениях биологической защиты.

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

Список литературы

1. Shchelkunov S.N., Marenikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. New York: Springer; 2005. 425 p.
2. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12):e1003756. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003756.
3. Whitley R.J. Smallpox: a potential agent of bioterrorism. *Antiviral Res.* 2003; 57(1–2):7–12. DOI: 10.1016/s0166-3542(02)00195-x.
4. Wallin A., Luksiene Z., Zagminas K., Surkiene G. Public health and bioterrorism: renewed threat of anthrax and smallpox. *Medicina (Kaunas)*. 2007; 43(4):278–84.
5. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Smith J.O., Kisalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010; 107(37):16262–7. DOI: 10.1073/pnas.1005769107.
6. Rimoin A., Graham B. Whither monkeypox vaccination. *Vaccine*. 2011; 29Suppl4(Suppl4):D60–4. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.09.004.
7. McCollum A.M., Damon I.K. Human monkeypox. *Clin. Infect. Dis.* 2014; 58(2):260–7. DOI: 10.1093/cid/cit703.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of monkeypox. Illinois, Indiana and Wisconsin: JAMA; 2003. P. 30–31.
9. Wiacek K., Cwynar J., Bursa D., Horban A., Telega G., Mazur A. A case of cowpox virus infection in a 15-year-old boy and literature overview. *Pediatria polska*. 2017; 92:778–80. DOI: 10.1016/j.pepo.2017.07.004.
10. Vorou R.M., Papavassiliou V.G., Pierroutsakos I.N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21(2):153–6. DOI: 10.1097/QCO.0b013e3282f44c74.
11. Trindade G.S., Lobato Z.I., Drumond B.P., Leite J.A., Trigueiro R.C., Guedes M.I., da Fonseca F.G., dos Santos J.R., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. Short report: isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75(3):486–90.
12. Townsend M.B., MacNeil A., Reynolds M.G., Hughes C.M., Olson V.A., Damon I.K., Karem K.L. Evaluation of the Tetracore Orthopox BioThreat® antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens. *J. Virol. Meth.* 2013; 187(1):37–42. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.08.023.
13. Mabey D., Peeling R.W., Ustianowski A., Perkins M.D. Diagnostics for the developing world. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2:231–40. DOI: 10.1038/nrmicro841.
14. Petersen K., McMillan W. IVD systems in bioterrorism response. *IVD Technol.* 2002; 3:12–9.
15. Gavrilova E., Shcherbakov D., Maksutov R., Shchelkunov S. Development of real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(1):37–40. DOI: 10.1016/j.jcv.2010.06.003.
16. Stern D., Olson V., Smith S., Pietraszczyk M., Miller L., Miethe P., Dorner B., Nitsche A. Rapid and sensitive point-of-care detection of orthopoxviruses by ABICAP immunofiltration. *Virol. J.* 2016; 13(1):207. DOI: 10.1186/s12985-016-0665-5.
17. Stern D., Pauly D., Zydek M., Miller L., Piesker J., Laue M., Lisdat F., Dorner M.B., Dorner B.G., Nitsche A. Development of a genus-specific antigen capture ELISA for orthopoxviruses – target selection and optimized screening. *PLoS ONE*. 2016; 11(3):e0150110. DOI: 10.1371/journal.pone.0150110.
18. Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Таранов О.С., Якубицкий С.Н., Филатов П.В. Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus, Chordopoxvirinae, Poxviridae*). *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(6):291–7. DOI: 10.3623/0507-4088-2019-64-6-291-297.
19. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington: National Academies Press; 1996. 154 p.
20. Poltavchenko A.G., Zaytzev B.N., Ersh A.V., Korneev D.V., Taranov O.S., Filatov P.V., Nechitaylo O.V. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37(5):540–54. DOI: 10.1080/15321819.2016.1174134.
21. Poltavchenko A., Zaitsev B., Ersh A., Taranov O., Korneev D., Nikonorov A. Selection of Substrate Material for Protein Arrays. *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.* 2016; 52(2):301–7. DOI: 10.1134/S2070205116020234.
22. Сергеев Ал.А., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев Ар.А., Боднев С.А., Кабанов А.С., Туманов Ю.В., Юрбанова И.А., Шишкина Л.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Чувствительность различных видов животных к вирусу оспы обезьян. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; 11(1):88–91. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-1(111)-88-91.
23. Czerny C.P., Meyer H., Mahnel H. Establishment of an ELISA for the detection of orthopox viruses based on neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Zentralbl. Veterinarmed B*. 1989; 36(7):537–46. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1989.tb00641.x.
24. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N., Blum D., Hughes L., Satheshkumar P., Townsend M., Kondas A., Reed Z., Weiner Z., Olson V., Hammarlund E., Raue H., Slifka M., Slaughter J., Graham B., Edwards K., Eisenberg R., Cohen G., Joyce S., Crowe J. Cross-Neutralizing and Protective Human Antibody Specificities to Poxvirus Infections. *Cell*. 2016; 167(3):684–94. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.049.

References

1. Shchelkunov S.N., Marenikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. New York: Springer; 2005. 425 p.
2. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12):e1003756. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003756.
3. Whitley R.J. Smallpox: a potential agent of bioterrorism. *Antiviral Res.* 2003; 57(1–2):7–12. DOI: 10.1016/s0166-3542(02)00195-x.
4. Wallin A., Luksiene Z., Zagminas K., Surkiene G. Public health and bioterrorism: renewed threat of anthrax and smallpox. *Medicina (Kaunas)*. 2007; 43(4):278–84.
5. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Smith J.O., Kisalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010; 107(37):16262–7. DOI: 10.1073/pnas.1005769107.
6. Rimoin A., Graham B. Whither monkeypox vaccination. *Vaccine*. 2011; 29Suppl4(Suppl4):D60–4. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.09.004.
7. McCollum A.M., Damon I.K. Human monkeypox. *Clin. Infect. Dis.* 2014; 58(2):260–7. DOI: 10.1093/cid/cit703.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of monkeypox. Illinois, Indiana and Wisconsin: JAMA; 2003. P. 30–31.
9. Wiacek K., Cwynar J., Bursa D., Horban A., Telega G., Mazur A. A case of cowpox virus infection in a 15-year-old boy and literature overview. *Pediatria polska*. 2017; 92:778–80. DOI: 10.1016/j.pepo.2017.07.004.
10. Vorou R.M., Papavassiliou V.G., Pierroutsakos I.N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21(2):153–6. DOI: 10.1097/QCO.0b013e3282f44c74.
11. Trindade G.S., Lobato Z.I., Drumond B.P., Leite J.A., Trigueiro R.C., Guedes M.I., da Fonseca F.G., dos Santos J.R.,

- Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. Short report: isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75(3):486–90.
12. Townsend M.B., MacNeil A., Reynolds M.G., Hughes C.M., Olson V.A., Damon I.K., Karem K.L. Evaluation of the Tetracore Orthopox BioThreat® antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens. *J. Virol. Meth.* 2013; 187(1):37–42. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.08.023.
 13. Mabey D., Peeling R.W., Ustianowski A., Perkins M.D. Diagnostics for the developing world. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2:231–40. DOI: 10.1038/nrmicro841.
 14. Petersen K., McMillan W. IVD systems in bioterrorism response. *IVD Technol.* 2002; 3:12–9.
 15. Gavrilova E., Shcherbakov D., Maksyutov R., Shchelkunov S. Development of real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(1):37–40. DOI: 10.1016/j.jcv.2010.06.003.
 16. Stern D., Olson V., Smith S., Pietraszczyk M., Miller L., Miethe P., Dorner B., Nitsche A. Rapid and sensitive point-of-care detection of orthopoxviruses by ABICAP immunofiltration. *Virol. J.* 2016; 13(1):207. DOI: 10.1186/s12985-016-0665-5.
 17. Stern D., Pauly D., Zydek M., Miller L., Piesker J., Laue M., Lisdat F., Dorner M.B., Dorner B.G., Nitsche A. Development of a genus-specific antigen capture ELISA for orthopoxviruses – target selection and optimized screening. *PLoS ONE.* 2016; 11(3):e0150110. DOI: 10.1371/journal.pone.0150110.
 18. Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Taranov O.S., Yakubitskiy S.N., Filatov P.V. Rapid immunochemical method for the detection of orthopoxviruses (*Orthopoxvirus, Chordopoxvirinae, Poxviridae*). *Voprosy Virusologii [Problems of Virology].* 2019; 64(6):291–7. DOI: 10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297.
 19. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington: National Academies Press; 1996. 154 p.
 20. Poltavchenko A.G., Zaytsev B.N., Ersh A.V., Korneev D.V., Taranov O.S., Filatov P.V., Nechitaylo O.V. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37(5):540–54. DOI: 10.1080/15321819.2016.1174134.
 21. Poltavchenko A., Zaitsev B., Ersh A., Taranov O., Korneev D., Nikonorov A. Selection of Substrate Material for Protein Arrays. *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.* 2016; 52(2):301–7. DOI: 10.1134/S2070205116020234.
 22. Sergeev A.A., Bulychev L.E., P'yankov O.V., Sergeev A.A., Bodnev S.A., Kabanov A.S., Tumanov Yu.V., Yurganova I.A., Shishkina L.N., Agafonov A.P., Sergeev A.N. Sensitivity of different animal species to monkeypox virus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii. [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2012; 11(1):88–91. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-1(11)-88-91.
 23. Czerny C.P., Meyer H., Mahnel H. Establishment of an ELISA for the detection of orthopox viruses based on neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Zentralbl. Veterinarmed B.* 1989; 36(7):537–46. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1989.tb00641.x.
 24. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N., Blum D., Hughes L., Satheshkumar P., Townsend M., Kondas A., Reed Z., Weiner Z., Olson V., Hammarlund E., Raue H., Slifka M., Slaughter J., Graham B., Edwards K., Eisenberg R., Cohen G., Joyce S., Crowe J. Cross-Neutralizing and Protective Human Antibody Specificities to Poxvirus Infections. *Cell.* 2016; 167(3):684–94. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.049.

Authors:

Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Filatov P.V., Ushkalenko N.D., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.I.A., Shcherbakov D.N. State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk region, Russian Federation, 630559. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Об авторах:

Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Филатов П.В., Ушканенко Н.Д., Якубичкин С.Н., Сергеев А.А., Щербаков Д.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

**А.Ю. Попова^{1,7}, Е.Б. Ежлова¹, Ю.В. Дёмина^{1,7}, А.А. Мельникова¹, О.П. Курганова², Н.Н. Фомкина¹,
О.М. Юргина³, Е.Н. Бурдинская³, О.Е. Троценко⁴, А.А. Тотолян⁵, Т.В. Корита⁴, Е.А. Базыкина⁴,
В.О. Котова⁴, Д.В. Конов⁶, М.Ю. Карисалов⁶**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ МЕР, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПОРЯДОК ДОПУСКА К РАБОТЕ ВАХТОВЫМ МЕТОДОМ НА ФОНЕ ПАНДЕМИИ COVID-19

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

²Управление Роспотребнадзора по Амурской области, Благовещенск-на-Амуре, Российская Федерация; ³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Амурской области», Благовещенск-на-Амуре, Российская Федерация; ⁴ФБУН «Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии», Хабаровск, Российская Федерация;

⁵ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ⁶ПАО «Сибур Холдинг», Москва, Российская Федерация;

⁷ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Российская Федерация

Цель – оценка эффективности противоэпидемических мер, применяемых в отношении работников Амурского газоперерабатывающего завода, привлекаемых для работы вахтовым методом в условиях пандемии COVID-19. **Материалы и методы.** Серо-эпидемиологическое исследование включало анкетирование 1461 работника, прибывшего по «чистому коридору» в Амурсскую область, с последующим забором у них биологического материала (кровь и респираторные мазки). Тестирование сывороток крови на наличие антител к SARS-CoV-2 двух классов (IgM и IgG) осуществляли методом иммуноферментного анализа. С помощью ПЦР исследованы респираторные мазки на присутствие в них РНК возбудителя. Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием общепринятых методов. **Результаты и обсуждение.** Выявлено наличие антител класса IgG в (4,7±0,55) % случаев. У незначительной части (1,7±0,34 %) практически здоровых лиц выявлено бессимптомное инфицирование, подтвержденное либо положительным результатом ПЦР (0,76±0,23 %), либо обнаружением антител класса IgM (1,0±0,08 %). На основе проведенного Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека исследования 01.08.2020 утверждены «Временные рекомендации по порядку допуска к работе вахтовым методом в условиях рисков распространения COVID-19 в Амурской области», определившие алгоритм действий при прохождении обсервации прибывшими в регион работниками и порядок сортировки вахтовых рабочих после тестирования методами ИФА и ПЦР. Результаты проведенного исследования демонстрируют эффективность противоэпидемических мероприятий, связанных с обеспечением порядка допуска к работе вахтовым методом в условиях рисков распространения COVID-19.

Ключевые слова: пандемия COVID-19, Амурский газоперерабатывающий завод, вахтовый метод труда, иммунитет, РНК вируса SARS-CoV-2, обсервация.

Корреспондирующий автор: Базыкина Елена Анатольевна, e-mail: adm@hniiem.ru.

Для цитирования: Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Дёмина Ю.В., Мельникова А.А., Курганова О.П., Фомкина Н.Н., Юргина О.М., Бурдинская Е.Н., Троценко О.Е., Тотолян А.А., Корита Т.В., Базыкина Е.А., Котова В.О., Конов Д.В., Карисалов М.Ю. Эффективность противоэпидемических мер, обеспечивающих порядок допуска к работе вахтовым методом на фоне пандемии COVID-19. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 3:114–121. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-114-121.

Поступила 12.02.2021. Отправлена на доработку 03.03.2021. Принята к публ. 18.03.2021.

**A.Yu. Popova^{1,7}, E.B. Ezhlova¹, Yu.V. Demina^{1,7}, A.A. Mel'nikova¹, O.P. Kurganova², N.N. Fomkina¹,
O.M. Yurgina³, E.N. Burdinskaya³, O.E. Trotsenko⁴, A.A. Totolyan⁵, T.V. Korita⁴, E.A. Bazikina⁴,
V.O. Kotova⁴, D.V. Konov⁶, M.Yu. Karisalov⁶**

Efficiency of Anti-Epidemic Measures that Ensure Access to Work in Rotational Shifts under Conditions of Covid-19 Pandemic

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

²Rospotrebnadzor Administration in the Amur Region, Blagoveshchensk-on-Amur, Russian Federation;

³Center of Hygiene and Epidemiology in the Amur Region, Blagoveshchensk-on-Amur, Russian Federation;

⁴Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

⁵Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russian Federation;

⁶PJSC “Sibur Holding”, Moscow, Russian Federation;

⁷Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation

Abstract. Objective – integral analysis of effectiveness of anti-epidemic measures applied towards employees of the Amur gas processing plant assigned for rotational work under conditions of COVID-19 pandemic. **Materials and methods.** Sero-epidemiological study included a questionnaire survey of 1461 workers who arrived through the “clean corridor” in the Amur Region, followed by sampling of biological material (blood and respiratory smears). Testing of blood sera for the presence of antibodies to SARS-CoV-2 of two classes (IgM and IgG) was carried out applying enzyme immunoassay. Using PCR, respiratory smears were examined for the presence of the agent RNA in them. Statistical processing of the results obtained was carried out using conventional methods. **Results and discussion.** The presence of antibodies of the IgG class was revealed in (4.7±0.55) % of cases. In a small cohort (1.7±0.34 %) of practically healthy individuals, asymptomatic infection was detected, confirmed either by a positive PCR result (0.76±0.23 %), or by the detection of IgM antibodies (1.0±0.08 %). On the basis of the study carried out by the Federal Service for Surveillance

in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare on August 01, 2020, "Temporary recommendations on the procedure for admitting to work on a rotational basis under the risk of COVID-19 spread in the Amur Region" were approved. These recommendations set out the algorithm for observation of incoming workers and the order for triage of shift workers after testing by ELISA and PCR. The results of the study demonstrate the effectiveness of anti-epidemic measures related to ensuring the procedure for admission to work on a rotational basis under the risks of the spread of COVID-19.

Key words: COVID-19 pandemic, Amur gas processing plant, rotational assignments, immunity, SARS-CoV-2 RNA, observation.

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

Corresponding author: Elena A. Bazikina, e-mail: adm@chniem.ru.

Citation: Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Mel'nikova A.A., Kurganova O.P., Fomkina N.N., Yurgina O.M., Burdinskaya E.N., Trotsenko O.E., Totolyan A.A., Korita T.V., Bazikina E.A., Kotova V.O., Konov D.V., Karisalov M.Yu. Efficiency of Anti-Epidemic Measures that Ensure Access to Work in Rotational Shifts under Conditions of Covid-19 Pandemic. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:114–121. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-114-121.

Received 12.02.2021. Revised 03.03.2021. Accepted 18.03.2021.

Popova A.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-5307>
Trotsenko O.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3050-4472>
Totolyan A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Bazikina E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5695-6752>
Kotova V.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9824-7025>

Пандемия новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, обладающим высоким эпидемическим потенциалом [1–4], представляет глобальную угрозу безопасности. В Российской Федерации оперативно введены беспрецедентные меры по предотвращению завоза и распространения COVID-19. Проведение мероприятий по санитарной охране страны позволило отодвинуть сроки появления первых случаев COVID-19 в России и провести существенную подготовку медицинской базы [5]. Применение комплекса противоэпидемических (профилактических) мер помогло сдержать безущербное распространение инфекции в стране [6].

Пандемия COVID-19 внесла существенные корректировки в порядок организации работы вахтовым методом. Вахтовый метод – это особая форма осуществления трудового процесса вне места постоянного проживания работников. Труду лиц, работающих вахтовым методом, присущи такие специфические особенности, как работа в экономически успешных отраслях, но в труднодоступных или малозаселенных местностях; особые условия труда и специфический график работы с определенной продолжительностью рабочего времени и времени отдыха; проживание в периоды занятости на вахте в специально оборудованных вахтовых поселках, общежитиях, соответствующих определенным требованиям; надлежащая организация питания, отдыха, досуга, медицинского обслуживания. К организациям, активно использующим вахтовый метод работы, относится крупнейшая российская компания ПАО «Сибур Холдинг», которая системно подошла к реагированию и активным действиям по недопущению распространения новой коронавирусной инфекции, сфокусировав внимание на охране здоровья своих сотрудников и партнеров. В состав данной компании входят предприятия, осуществляющие деятельность на территории строительства Амурского газоперерабатывающего завода (АГПЗ).

В целях недопущения заноса и распространения новой коронавирусной инфекции среди вахтовых ра-

бочих Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 29.05.2020 утвержден «Регламент организации и обеспечения прибытия и пребывания вахтовых работников Амурского газоперерабатывающего завода (АГПЗ)» (далее – Регламент). Регламент определил необходимость проведения 14-дневного карантина мобилизуемых на строительство АГПЗ работников перед вылетом в Амурскую область и включал: проведение ПЦР-тестирования на COVID-19 на 10-й день карантинного срока; обеспечение «чистого коридора» при перелете; осуществление медицинского осмотра и тестирования работников по прибытию; соблюдение противоэпидемических мероприятий при осуществлении работ на АГПЗ. Кроме того, для минимизации рисков осложнения эпидемиологической ситуации прибывшие работники дополнительно в течение 14 дней после прибытия находились в обсерваторах.

Следует отметить достаточно большой приток вахтовых рабочих на АГПЗ. Так, только в период с 01.07.2020 по 12.07.2020 по «чистому коридору» на территорию Амурской области прибыло 1604 работника, из них находились в условиях обсервации в Новосибирской области 614 человек, Волгоградской области – 444, Свердловской области – 124, Московской области – 255, в Москве – 167.

Одним из лимитирующих факторов в отношении распространения вируса SARS-CoV-2 в условиях работы вахтовым методом является уровень иммунитета к данному возбудителю у работников, прибывающих из регионов с разной степенью активности эпидемического процесса COVID-19. Получение информации о состоянии иммунитета у работников позволит прогнозировать развитие эпидемиологической ситуации и заблаговременно планировать адекватные меры профилактики COVID-19.

Цель работы – комплексный анализ оценки эффективности противоэпидемических мер, применяемых в отношении работников АГПЗ, работающих вахтовым методом в условиях пандемии COVID-19.

Материалы и методы

Для оценки эффективности профилактических мероприятий, проводимых в рамках Регламента, в период с 14.07.2020 по 01.08.2020 проведено серо-эпидемиологическое исследование лиц, привлекаемых для работы вахтовым методом на АГПЗ. В исследовании принял участие 1461 волонтер. Среди обследованных были лица, занятые на работе вахтовым методом на АГПЗ, расположенным на территории Свободненского района Амурской области. В исследование были вовлечены работники четырех подрядных организаций АГПЗ (№ 1, 2, 3, 4) с числом обследованных лиц 656, 145, 241, 419 человек соответственно.

Группы волонтеров распределены и по региону отправления в Амурскую область: прибывшие из Новосибирской области – 419, из Москвы и Московской области – 417, Волгоградской области – 373, Свердловской области – 252 человека.

Учитывая специфику работы предприятия, в группе обследованных преобладали мужчины (94 %). Было сформировано пять возрастных групп: 18–29, 30–39, 40–49, 50–59, 60–69 лет.

В период с 14.07.2020 по 18.07.2020 проведено анкетирование лиц, прибывших по «чистому коридору» на территорию Амурской области с 01.07.2020 по 12.07.2020 для осуществления трудовой деятельности на АГПЗ. Результаты анкетирования занесены в электронную базу данных в формате Excel.

С 19.07.2020 по 23.07.2020 проведено взятие клинических образцов (кровь, мазки из носо- и ротоглотки) у волонтеров, не имеющих признаков респираторного заболевания. Выявление антител к вирусу SARS-CoV-2 класса IgG и IgM проводили методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем «SARS-CoV-2-иммуноглобулины-G-ИФА-Бест» и «SARS-CoV-2-иммуноглобулины-М-ИФА-Бест» (производитель – ОАО «Вектор-Бест», Новосибирск) согласно прилагаемым к наборам инструкциям. ПЦР-исследование респираторных мазков выполняли с использованием тест-систем «Вектор-ПЦР-2019-nCoV-RG» (производитель – ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово) в соответствии с инструкцией производителя.

Оценка статистической значимости разности показателей между сравниваемыми выборками осуществлена с помощью t-критерия Стьюдента. Для оценки взаимосвязи между признаками применен метод корреляционно-регрессионного анализа, в качестве показателя тесноты связи использован коэффициент корреляции (r) Пирсона, значения которого интерпретированы в соответствии со шкалой Чеддока [7].

Результаты и обсуждение

Анализ выборки обследованных добровольцев показал, что наиболее многочисленной была возрастная группа 30–39 лет (582 человека, или

39,8 %, в том числе 96,9 % мужчин и 3,1 % женщин). Удельный вес лиц в возрасте 40–49 лет и 18–29 лет составил 22,1 % (323 человека) и 24,2 % (353 человека) соответственно. Наименьший удельный вес пришелся на возрастные группы 50–59 лет (185 человек, или 12,7 %) и 60–69 лет (18 человек, или 1,2 %).

Среди обследованных работников АГПЗ доля серопозитивных лиц к SARS-CoV-2 (наличие антигенов класса IgG) составила ($4,7 \pm 0,55$) % (69 человек). Доля серопозитивных лиц среди всех обследованных в возрастном аспекте представлена на рис. 1. Информативность данных по группе волонтеров 60–69 лет вызывает сомнения ввиду малочисленности участников. Различия между долей серопозитивных лиц среди разных возрастных групп в сопоставлении со средним значением ($4,7 \pm 0,55$ %) оказались статистически незначимыми ($p > 0,05$).

Сравнительный анализ частоты выявления IgG-антител к SARS-CoV-2 у лиц разного пола в данном исследовании не показателен в связи с доминирующим большинством мужчин среди лиц, охваченных наблюдением.

Анализ серопревалентности к SARS-CoV-2 у работников АГПЗ в зависимости от их принадлежности к подрядной организации представлен на рис. 2. Доля серопозитивных лиц среди работников четырех предприятий находилась в диапазоне от ($1,2 \pm 0,70$) %

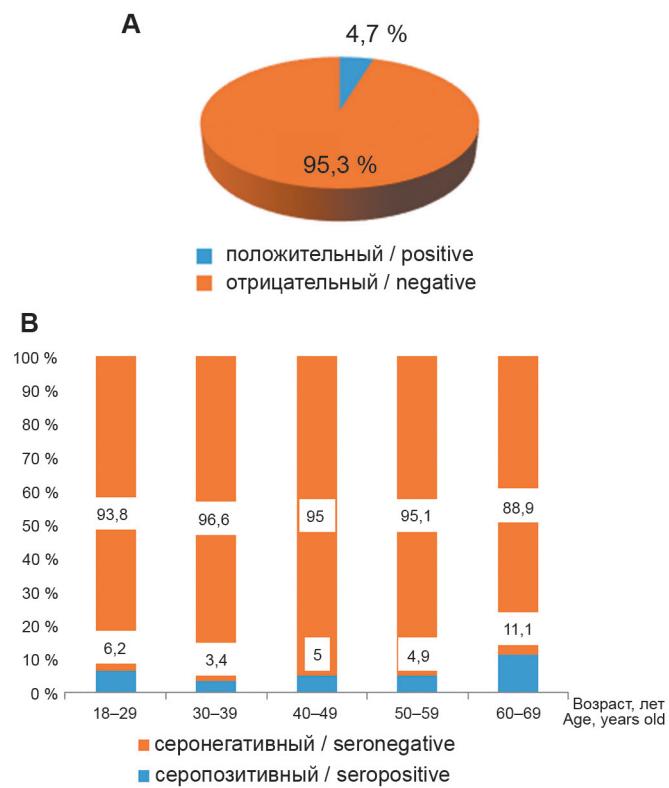


Рис. 1. Частота (%) выявления IgG-антител к SARS-CoV-2 среди волонтеров АГПЗ:

A – в целом; *B* – по возрастным группам

Fig. 1. Frequency of detection of IgG antibodies against SARS-CoV-2 (%) in different age groups among volunteers of the Amur Gas Processing Plant:

A – in general; *B* – by age groups

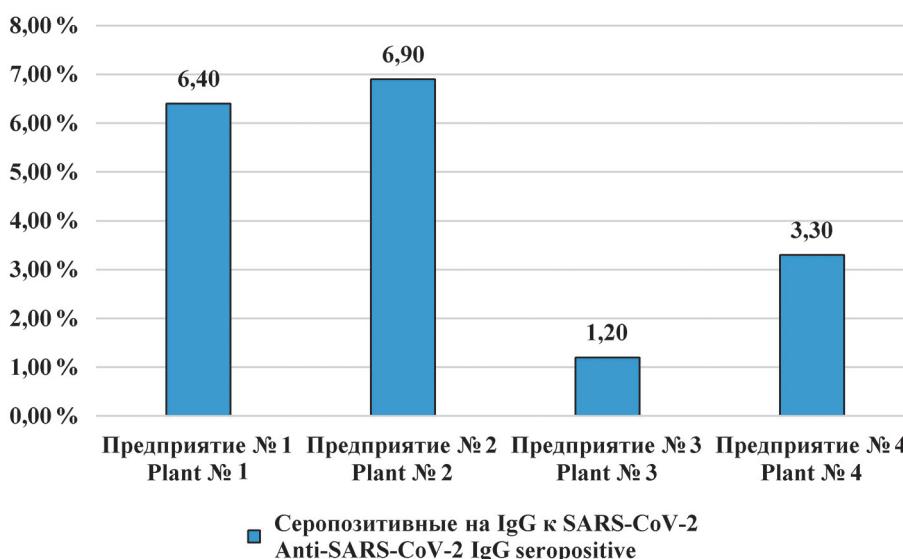


Рис. 2. Частота (%) выявления IgG-антител к SARS-CoV-2 среди волонтеров АГПЗ в зависимости от принадлежности к подрядной организации

Fig. 2. Frequency of detection of IgG antibodies against SARS-CoV-2 (%) among volunteers of the Amur Gas Processing Plant depending upon affiliation to contracting organization

до $(6,9 \pm 2,10)\%$, при этом различия по этому показателю между предприятиями № 2 и 3 оказались статистически значимыми ($p < 0,05$).

Установлено, что наибольшее число серопозитивных лиц прибыло из обсерваторов Москвы и Московской области – $(7,2 \pm 1,27)\%$, а также Волгоградской области – $(6,4 \pm 1,27)\%$, наименьшее – из обсерваторов Новосибирской и Свердловской областей – $(2,4 \pm 0,75)$ и $(2,0 \pm 0,88)\%$ соответственно, разница между высокими и низкими значениями статистически достоверна, $p < 0,01$ (табл. 1).

При этом в зависимости от даты прибытия в Амурскую область удельный вес серопозитивных лиц варьировал среди тех, кто находился в обсерваторах Москвы и Московской области – от 2,9 до 11,1 %, Волгоградской области – от 2,3 до 10,2 %, Новосибирской области – от 1,7 до 5,9 % (рис. 3).

Анализ заболеваемости COVID-19, проведенный на 19.07.2020 среди населения указанных территорий, показал, что ее уровень (число случаев

на 100 тыс. населения нарастающим итогом) был наиболее высоким в Москве и Московской области (соответственно 1819,22 и 791,67 на 100 тыс. населения), в 3,6 и 1,9 раза превысив средний показатель по России (504,23 на 100 тыс. населения). Напротив, в Новосибирской, Волгоградской и Свердловской областях аналогичные показатели были меньше среднероссийского (268,21; 323,4 и 411,30 на 100 тыс. населения). Удельный вес волонтеров, регионами отправления которых были Москва и Московская область, оказался значительно выше на предприятиях АГПЗ № 1 и 2 (соответственно $(38,9 \pm 1,9)\%$ и $(33,8 \pm 3,9)\%$), чем на предприятиях № 3 и 4 (соответственно $(8,3 \pm 1,8)\%$ и $(22,2 \pm 2,0)\%$, $p < 0,01$). Более того, методом корреляционно-регрессионного анализа выявлена прямая и высокая (по шкале Чеддока) сила связи ($r = 0,968$, $p = 0,116$) между средним удельным весом серопозитивных на IgG к SARS-CoV-2 лиц (соответственно $(6,4 \pm 0,96)$, $(6,9 \pm 2,10)$, $(1,2 \pm 0,70)$ и $(3,3 \pm 0,87)\%$ на

Таблица 1 / Table 1

Частота (%) выявления IgG- и IgM-антител к SARS-CoV-2 среди работников АГПЗ в зависимости от мест отправления в Амурскую область
Frequency of detection of IgG and IgM antibodies against SARS-CoV-2 (%) among workers of the Amur Gas Processing Plant based on point of departure to the Amur Region

Место (обсерваторы) отправления в Амурскую область Point of departure (observation facility) to the Amur Region	Численность обследованных, чел. Group size	Количество положительных на IgG Number of positive for IgG individuals		Количество положительных на IgM Number of positive for IgM individuals		Всего положительных на IgG+IgM Total number of positive for IgG+IgM individuals	
		абс. число absolute number	удельный вес, % percentage, %	абс. число absolute number	удельный вес, % percentage, %	абс. число absolute number	удельный вес, % percentage, %
Москва и Московская обл. Moscow and Moscow Region	417	30	$7,2 \pm 1,27$	9	$2,2 \pm 0,52$	39	$9,4 \pm 1,43$
Новосибирская область Novosibirsk Region	419	10	$2,4 \pm 0,75$	2	$0,5 \pm 0,34$	12	$2,9 \pm 0,82$
Волгоградская область Volgograd Region	373	24	$6,4 \pm 1,27$	2	$0,5 \pm 0,37$	26	$7,0 \pm 1,32$
Свердловская область Sverdlovsk Region	252	5	$2,0 \pm 0,88$	1	$0,4 \pm 0,40$	6	$2,4 \pm 0,96$
<i>Итого Total</i>	1461	69	$4,7 \pm 0,55$	14	$1,0 \pm 0,08$	83	$5,7 \pm 0,61$

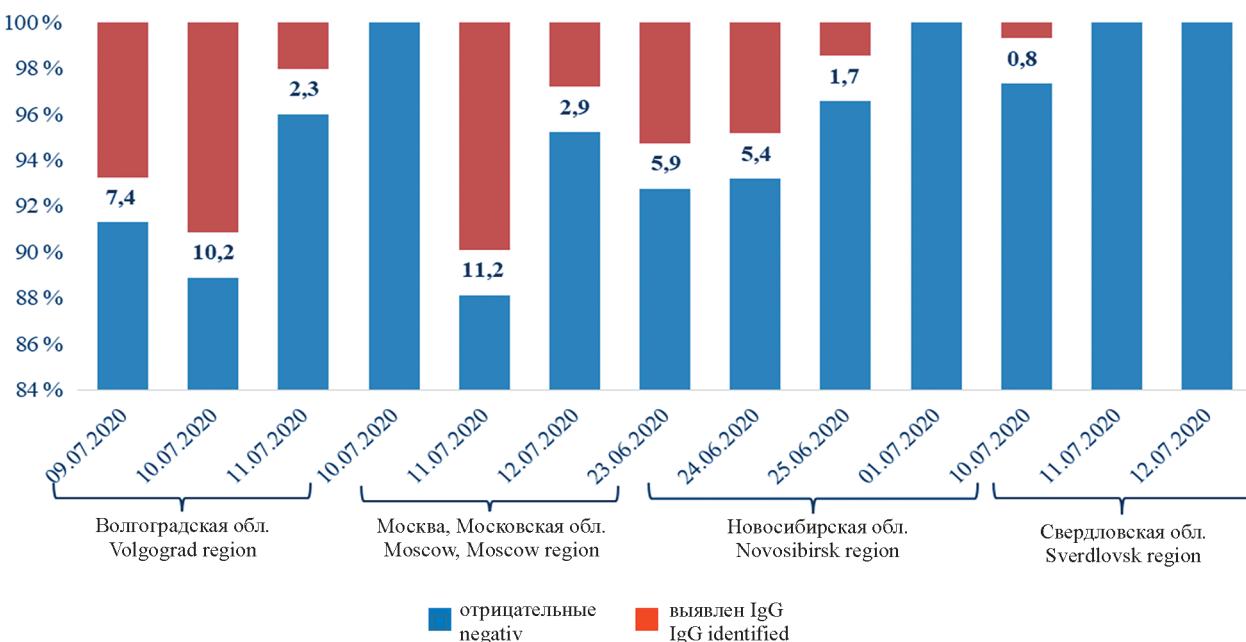


Рис. 3. Частота (%) выявления IgG-антител к SARS-CoV-2 среди волонтеров АГПЗ в зависимости от места обсервации и даты прибытия в Амурскую область

Fig. 3. Prevalence of IgG antibodies against SARS-CoV-2 (%) among workers of the Amur Gas Processing Plant by observation facility locale and the date of arrival in the Amur Region

предприятиях № 1, 2, 3 и 4) и долями прибывших из Москвы и Московской области волонтеров в каждом из четырех предприятий (соответственно $(38,9 \pm 1,9)$, $(33,8 \pm 3,9)$, $(8,3 \pm 1,8)$ и $(22,2 \pm 2,0)$ %). Таким образом, наиболее высокий уровень серопревалентности к SARS-CoV-2, установленный среди вахтовых работников предприятий № 1 и 2, может быть обусловлен более частым их прибытием из наиболее неблагополучных по заболеваемости COVID-19 регионов.

Следует отметить, что среди ИФА-отрицательных на IgG выявлено 14 волонтеров с антителами класса IgM к SARS-CoV-2, что составило $(1,0 \pm 0,08)$ % от совокупной выборки. В целом антитела обоих классов выявлены в $(5,7 \pm 0,61)$ % случаев среди всех лиц, охваченных данным исследованием.

Наибольший удельный вес лиц с наличием IgM пришелся на прибывших из обсерваторов Москвы и Московской области – $(2,2 \pm 0,52)$ %, разница данного показателя со средним аналогичным значением совокупной выборки $(1,0 \pm 0,08)$ % оказалась статистически значимой, $p < 0,05$. С учетом того, что антитела класса IgM выявляются, по данным литературы [8–11], начиная с 5-го дня от момента появления клинических симптомов, с максимумом определения на 3–4-й неделе (на 20–22-й день), можно предположить, что инфицирование этих волонтеров могло произойти незадолго до их пребывания на 14-дневном карантине в пунктах отправления (обсерваториях) Москвы и Московской области.

Особенностью данного исследования стало выявление РНК SARS-CoV-2 у серонегативных работников АГПЗ. Так, положительные результаты получены в 11 (из 1461) образцах смывов из носо-

ротоглотки, что составило $(0,76 \pm 0,23)$ %. Это может свидетельствовать о недавнем заражении (в течение последних двух недель) волонтеров и о детекции РНК возбудителя у них в период так называемого серонегативного окна [8]. На момент исследования у данных волонтеров отсутствовали клинические проявления, все они оказались жителями различных территорий и отрицали контакты с инфекционными больными, в том числе с зараженными COVID-19. Из 11 человек 2 работника предприятий АГПЗ прибыли в Амурскую область 23 и 24 июня 2020 г. после обсервации в Новосибирске. С учетом инкубационного периода и даты проведения их обследования (20 июля 2020 г.), можно сделать вывод, что заражение этих работников произошло уже на территории Амурской области. Остальные девять человек, ПЦР-положительные и серонегативные на IgM и IgG, прибыли на территорию Амурской области 11 и 12 июля 2020 г. после прохождения обсервации в Москве, их заражение могло произойти либо в период прохождения обсервации в Москве, либо после прибытия в Амурскую область.

Таким образом, выявлено наличие текущей инфекции у 25 (из 1461) работников АГПЗ $(1,7 \pm 0,34)$ %, в том числе по наличию положительного результата ПЦР в респираторном мазке у 11 $(0,76 \pm 0,23)$ % и по факту детекции IgM-антител к вирусу в крови у 14 человек $(1,0 \pm 0,08)$ %. Данная категория волонтеров, представлявшая риск заражения для окружающих, а также контактные с ними лица после получения результатов тестирования были помещены в изолятор для медицинского наблюдения. При этом максимум лиц с наличием текущей инфекции COVID-19

зарегистрирован среди прибывших из обсерваторов Москвы и Московской области (18 случаев из 25, что составило $(72,0 \pm 9,17)\%$).

Факт ранее перенесенной новой коронавирусной инфекции, подтвержденной обнаружением только антител класса IgG, отмечен у 69 из 1461 волонтера ($4,7 \pm 0,55\%$). По нашему мнению, большее значение в этих случаях имеет не место обсервации накануне отправки в АГПЗ, а территории постоянного проживания вахтовых рабочих. Анализ данных анкет показал, что волонтеры прибыли в Амурскую область из 72 регионов РФ, а также двух зарубежных стран (Сербии и Казахстана).

Большинство прибывших в Амурскую область участников исследования проживают в Волгоградской области – ($20,9 \pm 1,06\%$), Республике Башкортостан – ($10,8 \pm 0,81\%$) и Краснодарском крае – ($5,8 \pm 0,61\%$). При этом наибольший удельный вес лиц с положительным результатом ИФА на иммуноглобулины G отмечен среди прибывших из Ростовской, Самарской областей и Республики Бурятия, наименьший – из Свердловской и Омской областей (табл. 2). Однако разница в разбросах указанных значений по регионам проживания волонтеров оказалась статистически не значимой ($p > 0,05$).

Сопоставление интенсивных показателей заболеваемости COVID-19 населения регионов проживания рабочих, прибывших в АГПЗ, с частотой обна-

ружения у них антител класса IgG не выявило статистически значимой корреляционной связи между указанными признаками (коэффициент корреляции r оказался равным $-0,124$ при $p=0,717$).

Таким образом, проведенное исследование позволило получить объективные данные о профилактической эффективности мер, предусмотренных «Регламентом организации и обеспечения прибытия и пребывания вахтовых работников Амурского газоперерабатывающего завода (АГПЗ)». Установлено, что, несмотря на соблюдение мер, предписанных регламентом, у незначительной части ($1,7 \pm 0,34\%$) практически здоровых лиц, прибывших на вахтовые работы в Амурскую область, имеет место бессимптомное инфицирование вирусом SARS-CoV-2, подтвержденное либо положительным результатом ПЦР ($0,76 \pm 0,23\%$), либо ИФА на IgM ($1,0 \pm 0,08\%$).

Общая доля сероположительных лиц среди обследованных волонтеров составляла менее 5 %, что значительно ниже, чем в среднем в регионах, откуда прибывали вахтовые работники.

Полученные результаты исследования дают основание заключить, что введение с целью исключения заноса SARS-CoV-2 и риска его распространения комплекса мер как в рамках Регламента, так и дополнительной обсервации вахтовых рабочих после прибытия по «чистому коридору» было вполне обосновано.

Таблица 2 / Table 2

Частота (%) выявления IgG-антител к SARS-CoV-2 среди работников АГПЗ в зависимости от региона постоянного проживания

Frequency of detection of IgG antibodies against SARS-CoV-2 (%) among workers of the Amur Gas Processing Plant by the region of permanent residency

Регион проживания Region of permanent residency	Численность прибывших в Амурскую область, чел. Number of people arrived in the Amur Region	Абс. кол-во положительных на IgG Absolute number of IgG positive individuals	Удельный вес, % Percentage, %	Заболеваемость COVID-19 среди населения региона проживания на 19.07.2020 (на 100 тыс. населения) COVID-19 incidence among population of permanent residency region dated July 19, 2020 (per 100 000 population)
Волгоградская область Volgograd Region	306	14	$4,6 \pm 1,20$	323,4
Республика Башкортостан Republic of Bashkortostan	158	5	$3,2 \pm 1,40$	156,2
Краснодарский край Krasnodar Territory	85	4	$4,7 \pm 2,30$	126,7
Республика Бурятия Buryat Republic	66	4	$6,1 \pm 2,95$	370,3
Красноярский край Krasnoyarsk Territory	64	3	$4,7 \pm 2,65$	406,7
Свердловская область Sverdlovsk Region	61	1	$1,6 \pm 2,58$	411,3
Ставропольский край Stavropol Territory	50	2	$4,0 \pm 2,77$	245,7
Омская область Omsk Region	46	1	$2,2 \pm 2,16$	280,0
Иркутская область Irkutsk Region	45	2	$4,4 \pm 3,06$	486,2
Ростовская область Rostov Region	40	3	$7,5 \pm 4,16$	272,0
Самарская область Samara Region	32	2	$6,3 \pm 4,30$	198,8

На основании анализа результатов исследования Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 01.08.2020 утверждены «Временные рекомендации по порядку допуска к работе вахтовым методом в условиях рисков распространения COVID-19 в Амурской области», регламентирующие алгоритм действий при прохождении обсервации прибывшими в регион работниками и принцип одновременного их размещения в обсерваторы и лабораторного тестирования сразу по прибытии. Определенный порядок сортировки работников после тестирования, при котором работники с положительным результатом ИФА на антитела к SARS-CoV-2 класса IgG, но с отрицательными результатами на IgM и РНК исключаются из обсервации и по результатам медицинского заключения направляются к месту трудовой деятельности, а работники с положительным ИФА-результатом на IgM и/или выявленной РНК возбудителя подлежат изоляции в медицинскую организацию, а контактные с ними лица – медицинскому наблюдению, облегчает проведение и повышает эффективность применяемых профилактических мер в отношении вахтовых работников.

Необходимо отметить, что внедрение в практику работы АГПЗ указанного выше опыта на протяжении двух последующих месяцев показало, что частота выявления иммуноглобулинов G к SARS-CoV-2 среди прибывших до 01.10.2020 в Амурскую область 7647 вахтовых рабочих, проходивших обсервацию в других регионах Российской Федерации, возросла почти в 3,2 раза и составила (14,9±0,40) % (1142 человека), $p<0,001$. В то же время доля лиц с положительными результатами ПЦР на SARS-CoV-2, несмотря на увеличение почти в 2,8 раза ($p<0,001$), осталась по-прежнему незначительной – всего (2,1±0,16) % (158 человек). В результате апробации разработанного алгоритма сортировки прибывающих вахтовых рабочих, лица, имеющие в крови иммуноглобулины G к новой коронавирусной инфекции (1142 человека), после медицинского осмотра были сняты с обсервации на территории прибытия и направлены к месту работы. При этом новых случаев заболеваний COVID-19 среди прибывших в Амурскую область вахтовых рабочих после завершения обсервации не выявлено.

Результаты проведенного исследования демонстрируют эффективность противоэпидемических мероприятий, связанных с обеспечением порядка допуска к работе вахтовым методом в условиях рисков распространения COVID-19.

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

Список литературы

- Семёнов А.В., Пшеничная Н.Ю. Рожденная в Ухане: уроки эпидемии COVID-19 в Китае. *Инфекция и иммунитет*. 2020; 10(2):210–20. DOI: 10.15789/2220-7619-BIW-1453.
- Cucinotta D., Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed.* 2020; 91(1):157–60. DOI: 10.23750/abm.v91il.9397.
- Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г., Акимкин В.Г., Малеев В.В. История изучения и современная классификация коронавирусов (*Nidovirales: Coronaviridae*). *Инфекция и иммунитет*. 2020; 10(2):221–46. DOI: 10.15789/2220-7619-HOI-1412.
- Sencan I., Kuzi S. Global threat of COVID 19 and evacuation of the citizens of different countries. *Turk. J. Med. Sci.* 2020; 50:534–43. DOI: 10.3906/sag-2004-21.
- Брико Н.И., Карагамян И.Н., Никифоров В.В., Суранова Т.Г., Чернявская О.П., Полежаева Н.А. Пандемия COVID-19. Меры борьбы с ее распространением в Российской Федерации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020; 19(2):4–12. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-2-4-12.
- Кутырев В.В., Попова А.Ю., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Сафонов В.А., Карнаухов И.Г., Иванова А.В., Щербакова С.А. Эпидемиологические особенности новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Сообщение 2: особенности течения эпидемического процесса COVID-19 во взаимосвязи с проводимыми противоэпидемическими мероприятиями в мире и Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (2):6–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-6-12.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999. 459 с.
- Azkur A.K., Akdis M., Azkur D., Sokolowska M., Van de Veen W., Bruggen M.-Ch., O'Mahony L., Gao Ya., Nadeau K., Akdis C.A. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. 2020; 75(7):1564–81. DOI: 10.1111/all.14364.
- Long Q.-X., Liu B.-Z., Deng H.-J., Wu G.-C., Deng K., Chen Y.-K., Liao P., Qiu J.-F., Lin Y., Cai X.-F., Wang D.-Q., Hu Y., Ren J.-H., Tang N., Xu Y.-Y., Yu L.-H., Mo Z., Gong F., Zhang X.-L., Tian W.-G., Hu L., Zhang X.-X., Xiang J.-L., Du H.-X., Liu H.-W., Lang C.-H., Luo X.-H., Wu S.-B., Cui X.-P., Zhou Z., Zhu M.-M., Wang J., Xue C.-J., Li X.-F., Wang L., Li Z.-J., Wang K., Niu C.-C., Yang Q.-J., Tang X.-J., Zhang Y., Liu X.-M., Li J.-J., Zhang D.-C., Zhang F., Liu P., Yuan J., Li Q., Hu J.-L., Chen J., Huang A.-L. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.* 2020; 26(6):845–8. DOI: 10.1038/s41591-020-0897-1.
- Lee Y.-L., Liao C.-H., Liu P.-Y., Cheng C.-Y., Chung M.-Y., Liu C.-E., Chang S.-Y., Hsueh P.-R. Dynamics of anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies among COVID-19 patients. *J. Infect.* 2020; 81(2):e55–8. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.04.019.
- Guo L., Ren L., Yang S., Xiao M., Chang D., Yang F., Dela Cruz C.S., Wang Y., Wu C., Xiao Y., Zhang L., Han L., Dang S., Xu Y., Yang Q.-W., Xu S.-Y., Zhu H.-D., Xu Y.-C., Jin Q., Sharma L., Wang L., Wang J. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15):778–85. DOI: 10.1093/cid/ciaa310.

References

- Semenov A.V., Pshenichnaya N.Yu. [Born in Wuhan: lesson learned from COVID-19 epidemic in China]. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2020; 10(2):210–20. DOI: 10.15789/2220-7619-BIW-1453.
- Cucinotta D., Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed.* 2020; 91(1):157–60. DOI: 10.23750/abm.v91il.9397.
- Shchelkanov M.Yu., Popova A.Yu., Dedkov V.G., Akimkin V.G., Maleev V.V. [History of investigation and current classification of coronaviruses (*Nidovirales: Coronaviridae*)]. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2020; 10(2):221–46. DOI: 10.15789/2220-7619-HOI-1412.
- Sencan I., Kuzi S. Global threat of COVID 19 and evacuation of the citizens of different countries. *Turk. J. Med. Sci.* 2020; 50:534–43. DOI: 10.3906/sag-2004-21.
- Briko N.I., Kagramanyan I.N., Nikiforov V.V., Suranova T.G., Chernyavskaya O.P., Polozhaeva N.A. [Pandemic COVID-19. Prevention measures in the Russian Federation]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprophylaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2020; 19(2):4–12. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-2-4-12.
- Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Smolensky V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Safronov V.A., Karinaukhov I.G., Ivanova A.V., Shcherbakova S.A. [Epidemiological peculiarities of new coronavirus infection (COVID-2019). Communication 2: Peculiarities of epidemic process development in conjunction with performed anti-epidemic measures around the world and in the Russian Federation]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):6–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-6-12.
- Glants S. [Biomedical statistic]s. Moscow: "Practice"; 1999. 459 p.
- Azkur A.K., Akdis M., Azkur D., Sokolowska M., Van de Veen W., Bruggen M.-Ch., O'Mahony L., Gao Ya., Nadeau K., Akdis C.A. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. 2020; 75(7):1564–81. DOI: 10.1111/all.14364.

9. Long Q.-X., Liu B.-Z., Deng H.-J., Wu G.-C., Deng K., Chen Y.-K., Liao P., Qiu J.-F., Lin Y., Cai X.-F., Wang D.-Q., Hu Y., Ren J.-H., Tang N., Xu Y.-Y., Yu L.-H., Mo Z., Gong F., Zhang X.-L., Tian W.-G., Hu L., Zhang X.-X., Xiang J.-L., Du H.-X., Liu H.-W., Lang C.-H., Luo X.-H., Wu S.-B., Cui X.-P., Zhou Z., Zhu M.-M., Wang J., Xue C.-J., Li X.-F., Wang L., Li Z.-J., Wang K., Niu C.-C., Yang Q.-J., Tang X.-J., Zhang Y., Liu X.-M., Li J.-J., Zhang D.-C., Zhang F., Liu P., Yuan J., Li Q., Hu J.-L., Chen J., Huang A.-L. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.* 2020. 26(6):845–8. DOI: 10.1038/s41591-020-0897-1.

10. Lee Y.-L., Liao C.-H., Liu P.-Y., Cheng C.-Y., Chung M.-Y., Liu C.-E., Chang S.-Y., Hsueh P.-R. Dynamics of anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies among COVID-19 patients. *J. Infect.* 2020; 81(2):e55–8. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.04.019.

11. Guo L., Ren L., Yang S., Xiao M., Chang D., Yang F., Dela Cruz C.S., Wang Y., Wu C., Xiao Y., Zhang L., Han L., Dang S., Xu Y., Yang Q.-W., Xu S.-Y., Zhu H.-D., Xu Y.-C., Jin Q., Sharma L., Wang L., Wang J. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15):778–85. DOI: 10.1093/cid/ciaa310.

Authors:

Popova A.Yu., Demina Yu.V. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare; 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation. Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation.

Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Fomkina N.N. 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.

Kurganova O.P. Rospotrebnadzor Administration in the Amur Region. 30, Pervomayskaya St., Blagoveshchensk-on-Amur, 675002, Russian Federation.

Yurgina O.M., Burdinskaya E.N. Center of Hygiene and Epidemiology in the Amur Region. 30, Pervomayskaya St., Blagoveshchensk-on-Amur, 675002, Russian Federation.

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

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.

Konov D.V., Karisalov M.Yu. PJSC “Sibur Holding”. 16/1, Krzhizhanovsky St., Moscow, 117218, Russian Federation.

Об авторах:

Попова А.Ю., Демина Ю.В. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7. Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования; Российской Федерации, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.

Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Фомкина Н.Н. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Российской Федерации, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7.

Курганова О.П. Управление Роспотребнадзора по Амурской области. Российской Федерации, 675002, Благовещенск-на-Амуре, ул. Первомайская, 30.

Юргина О.М., Бурдинская Е.Н. Центр гигиены и эпидемиологии в Амурской области. Российской Федерации, 675002, Благовещенск-на-Амуре, ул. Первомайская, 30.

Троценко О.Е., Корита Т.В., Базыкина Е.А., Котова В.О. Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии. Российской Федерации, 680610, Хабаровск, ул. Шевченко, 2. E-mail: adm@hniem.ru.

Тотолян А.А. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Российской Федерации, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Конов Д.В., Карисалов М.Ю. ПАО «Сибур Холдинг». Российской Федерации, 117218, Москва, ул. Кржижановского, д. 16/1.

А.Ю. Попова^{1,2}, Т.А. Руженцова³, Д.А. Хавкина³, Л.Н. Туйчиев⁴, М.Д. Ахмедова⁴, М.М. Мадазимов⁵, К.Ш. Холматова⁶, О.В. Кедрова⁷, В.П. Смелянский⁸, С.В. Скрябина⁹, У.Б. Ахмедов¹⁰, И.Н. Шарова⁷, У.Э. Эралиев⁴, Г.К. Абдухалилова⁶, П.В. Чухляев³, А.А. Гарбузов¹¹, В.Г. Акимкин¹¹, Т.Ю. Акбаров¹², Ш.Б. Раҳматуллаева⁴, Ж.Ж. Жанибеков¹³

ОПЫТ МЕЖДУНАРОДНОГО СОТРУДНИЧЕСТВА ПО ОРГАНИЗАЦИИ УЧРЕЖДЕНИЯМИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ COVID-19 В РЕСПУБЛИКЕ УЗБЕКИСТАН

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

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

³ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского», Москва, Российская Федерация; ⁴Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Республика Узбекистан; ⁵Андижанский государственный медицинский институт, Андижан, Республика Узбекистан; ⁶Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний, Ташкент, Республика Узбекистан;

⁷ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российской Федерации;

⁸ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российской Федерации;

⁹Управление Роспотребнадзора по Свердловской области, Екатеринбург, Российской Федераци; ¹⁰ГУ «Республиканский специализированный научно-практический центр хирургии им. В. Вохидова», Ташкент, Республика Узбекистан;

¹¹ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», Москва, Российской Федерации;

¹²Детская городская инфекционная больница № 2, Ташкент, Республика Узбекистан; ¹³Республиканская детская инфекционная больница Республики Каракалпакстан, Нукус, Республика Узбекистан

Представлены результаты совместной работы группы экспертов Роспотребнадзора и специалистов в области здравоохранения Республики Узбекистан по организации мероприятий, противодействующих распространению вируса SARS-CoV-2. Цель – определить основные причины распространения COVID-19 в Республике Узбекистан и разработать план мероприятий для снижения заболеваемости коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2. **Материалы и методы.** Проанализирована организация работы в 14 учреждениях здравоохранения Ташкента и Самарканда, а также Ташкентской и Самаркандской областей: в 7 лабораториях, 6 стационарах и 1 поликлинике. Изучены маршруты перемещения персонала, разграничение зеленых и красных зон, особенности дезинфекции и использование средств индивидуальной защиты. Обращено внимание на диагностику COVID-19, применение терапии, направленной на сокращение периода выделения вируса, критерии снятия карантинных ограничений для пациентов. **Результаты и обсуждение.** Определены основные факторы в организации работы учреждений, способствующие распространению COVID-19 среди медицинского персонала и населения: отсутствие оборудованных шлюзов между красной и зеленой зонами с возможностью адекватной дезинфекции, неправильный выбор средств индивидуальной защиты, наблюдение за контактными лицами в течение 10 дней, выписка из стационаров на основании клинического улучшения. Отмечено неверное применение противовирусной терапии, отсутствие дифференцированных подходов к выбору оптимальных схем. Сформулированы предложения по организации работы учреждений здравоохранения с учетом требований по биологической безопасности. Внедрение целенаправленных мер в дополнение к ранее принятым привело к значительному улучшению эпидемической ситуации: общее число активных случаев в Республике Узбекистан, несмотря на увеличение объемов тестирования, снизилось с 3686 человек на 23 августа до 2335 на 27 октября, к 20 декабря 2020 г. 97 % заболевших полностью выздоровели. Все диагностические распределительные центры в Республике Узбекистан закрыты по причине отсутствия пациентов с COVID-19, большинство ранее перепрофилированных для больных коронавирусной инфекцией медицинских учреждений страны вернулись к обычному режиму работы.

Ключевые слова: пандемия, COVID-19, инфекционная безопасность, ПЦР, SARS-CoV-2, внутрибольничная инфекция.

Корреспондирующий автор: Руженцова Татьяна Александровна, e-mail: ruzhencova@gmail.com.

Для цитирования: Попова А.Ю., Руженцова Т.А., Хавкина Д.А., Туйчиев Л.Н., Ахмедова М.Д., Мадазимов М.М., Холматова К.Ш., Кедрова О.В., Смелянский В.П., Скрябина С.В., Ахмедов У.Б., Шарова И.Н., Эралиев У.Э., Абдухалилова Г.К., Чухляев П.В., Гарбузов А.А., Акимкин В.Г., Акбаров Т.Ю., Раҳматуллаева Ш.Б., Жанибеков Ж.Ж. Опыт международного сотрудничества по организации учреждениями здравоохранения противоэпидемических мероприятий в условиях пандемии COVID-19 в Республике Узбекистан. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 3:122–128. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-122-128.

Поступила 15.03.2021. Отправлена на доработку 05.04.2021. Принята к публ. 21.06.2021.

A.Yu. Popova^{1,2}, T.A. Ruzhentsova³, D.A. Khavkina³, L.N. Tuychiev⁴, M.D. Akhmedova⁴, M.M. Madazimov⁵, K.Sh. Kholmatova⁶, O.V. Kedrova⁷, V.P. Smelyansky⁸, S.V. Scryabina⁹, U.B. Akhmedov¹⁰, I.N. Sharova⁷, U.E. Eraliev⁴, G.K. Abdulkhalilova⁶, P.V. Chukhlyaev³, A.A. Garbuзов¹¹, V.G. Akimkin¹¹, T.Yu. Akbarov¹², Sh.B. Rakhatullaeva⁴, Zh.Zh. Zhanibekov¹³

Experience in International Cooperation on Organization of Anti-Epidemic Measures by Health Care Institutions under COVID-19 Pandemic in the Republic of Uzbekistan

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;

³Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.N. Gabrichevsky, Moscow, Russian Federation;

⁴Tashkent Medical Academy, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

⁵Andijan State Medical Institute, Andijan, Republic of Uzbekistan;

⁶Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Epidemiology, Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

⁷Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;

⁸Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation;

⁹Rospotrebnadzor Administration in the Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russian Federation;

¹⁰Republican Specialized Scientific and Practical Center for Surgery named after V. Vokhidov, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

¹¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

¹²Children's City Infectious Diseases Hospital No. 2, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

¹³Republican Children's Infectious Diseases Hospital of the Republic of Karakalpakstan, Nukus, Republic of Uzbekistan

Abstract. The results of the joint work of a panel of experts from Rospotrebnadzor and healthcare professionals of the Republic of Uzbekistan on organizing activities to counter the spread of the SARS-CoV-2 virus are described in the paper. The goal of the study was to determine the main driving forces of COVID-19 spread in the Republic of Uzbekistan and develop an action plan to reduce the incidence of coronavirus infection caused by the SARS-CoV-2 virus. **Materials and methods.** The organization of work in 14 health care institutions in Tashkent and Samarkand, as well as in Tashkent and Samarkand Regions, was analyzed: in 7 laboratories, 6 hospitals and 1 polyclinic. The routes for the movement of personnel, the demarcation of green and red zones, the features of disinfection and the use of personal protective equipment were studied. Attention is drawn to the diagnosis of COVID-19, the use of therapy aimed at reducing the period of virus shedding, the criteria for lifting quarantine restrictions for patients. **Results and discussion.** The main factors in the organization of work of institutions that contribute to the spread of COVID-19 among medical personnel and the population have been identified: the lack of equipped gateways between the red and green zones with the accessibility of adequate disinfection, the wrong choice of personal protective equipment, monitoring of contact persons for 10 days, discharge from hospitals based on clinical improvement. The incorrect use of antiviral therapy, the lack of differentiated approaches to the selection of optimal regimens have been noted. Proposals are formulated for organizing the work of healthcare institutions, taking into account the requirements of biological safety. The introduction of targeted measures in addition to those previously adopted has led to a significant improvement in the epidemic situation: the total number of active cases in the Republic of Uzbekistan, despite the increase in testing volumes, decreased from 3,686 people on August 23 to 2335 on October 27. Towards December 20, 2020, 97 % of patients recovered completely. All diagnostic triage centers in the Republic of Uzbekistan are closed due to the absence of patients with COVID-19, most of the country's medical institutions previously re-profiled for patients with coronavirus infection have returned to the routine operations.

Key words: pandemic, COVID-19, infectious safety, PCR, SARS-CoV-2, nosocomial infection.

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

Corresponding author: Tatyana A. Ruzhentsova, e-mail: ruzhencova@gmail.com.

Citation: Popova A.Yu., Ruzhentsova T.A., Khavkina D.A., Tuychiev L.N., Akhmedova M.D., Madazimov M.M., Kholmatova K.Sh., Kedrova O.V., Smelyansky V.P., Scryabina S.V., Akhmedov U.B., Sharova I.N., Eraliev U.E., Abdulkhalilova G.K., Chukhlyaev P.V., Garbulov A.A., Akimkin V.G., Akbarov T.Yu., Rakhmatullaeva Sh.B., Zhanibekov Zh.Zh. Experience in International Cooperation on Organization of Anti-Epidemic Measures by Health Care Institutions under COVID-19 Pandemic in the Republic of Uzbekistan. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3: 122–128. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-122-128.

Received 15.03.2021. Revised 05.04.2021. Accepted 21.06.2021.

Popova A.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-5307>
Ruzhentsova T.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6945-2019>
Khavkina D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5919-9841>
Tuychiev L.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3457-1616>
Akhmedova M.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5781-4003>
Madazimov M.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5066-580X>
Kholmatova K.Sh., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9702-816X>
Kedrova O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7400-8599>

Smelyansky V.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2403-4208>
Scryabina S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7182-6262>
Eraliev U.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7835-4517>
Chukhlyaev P.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1210-1215>
Garbulov A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3378-8418>
Akimkin V.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8139-0247>
Akbarov T.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6794-6480>
Rakhmatullaeva Sh.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7257-2081>

В августе и сентябре 2020 г. делегация экспертов Роспотребнадзора совместно со специалистами в области здравоохранения Республики Узбекистан провели работу по организации мероприятий, противодействующих распространению вируса SARS-CoV-2. Основные задачи: оценить организацию и эффективность противоэпидемических и лечебно-диагностических мероприятий, выявить причины, приводящие к большому числу тяжелых форм, определить пути снижения интенсивности распространения новой коронавирусной инфекции и улучшения исходов заболевания. Российская Федерация имеет большой опыт в борьбе с особо опасными инфекциями, в том числе с COVID-19, что отражено в официальных документах, которые, наряду с собственным опытом, стали основой для разработки необходимых мер (СП 1.3.3118-13; по-

становление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 30.03.2020 № 9).

В Республике Узбекистан мероприятия, направленные на предотвращение завоза и распространения новой коронавирусной инфекции, начаты в январе 2020 г. Распоряжением Президента Республики Узбекистан от 29.01.2020 создана Республиканская специальная комиссия. При Агентстве санитарно-эпидемиологического благополучия (СЭБ) при Министерстве здравоохранения Республики Узбекистан создан противоэпидемический штаб, которым разработан и утвержден план мероприятий по недопущению завоза и распространения новой коронавирусной инфекции (на узбекском языке), изданы шесть постановлений Главного государственного санитарного врача Республики Узбекистан.

Первый случай заболевания в Республике коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, выявлен 15 марта 2020 г. Интенсивный рост заболеваемости отмечен с начала июня, с числом летальных исходов от 3 до 7 в сутки, максимальное число новых случаев отмечено 4 августа – 981 пациент.

Сбор информации осуществляется через электронную систему, всего на 02.09.2020 зарегистрировано 42437 (0,12 % от общей численности населения – 34036800 человек) случаев COVID-19, летальных – 327 (0,77 %), выздоровело – 39863, на лечении находились 2248 человек.

Из особенностей страны, влияющих на распространение инфекции, можно выделить наличие сухопутной границы с Казахстаном, Туркменистаном, Таджикистаном, Киргизией и Афганистаном, откуда возможен дополнительный приток инфицированных. С целью ограничения распространения инфекции из других стран на территории Узбекистана организовано 53 санитарно-контрольных пункта: 11 – в международных аэропортах; 35 – на автомобильных пунктах пропуска; 6 – на железнодорожных узлах; 1 – в речном порту.

Во время распространения эпидемии COVID-19 международное сообщение было ограничено: после выявления 15 марта 2020 г. первого случая, с 23 марта постановлением правительства прекращено регулярное железнодорожное и авиасообщение, въезд на территорию страны автотранспорта разрешен только по специальным пропускам. Организованы карантинные центры для размещения граждан, прибывших на территорию Узбекистана из других стран. В период подъема заболеваемости COVID-19 с третьей декады июня по первые числа августа (рисунок), когда с 24 июля число регистрируемых случаев COVID-19 в день выросло до 600 и более, в дополнение к имеющимся инфекционным стационарам перепрофилировано около 80 соматических стационаров, имеющих суммарно более чем 30000 коек. В короткие сроки построены и оборудованы две специализированные больницы в Зангиатинском районе Ташкентской области на 4000

коек. Для проведения первичной диагностики и оказания первой врачебной помощи организованы два распределительных центра на базе выставочных комплексов «Узэкспоцентр» (в Ташкенте на 2000 коек) и «Багишамал» (в Самарканде на 1080 коек).

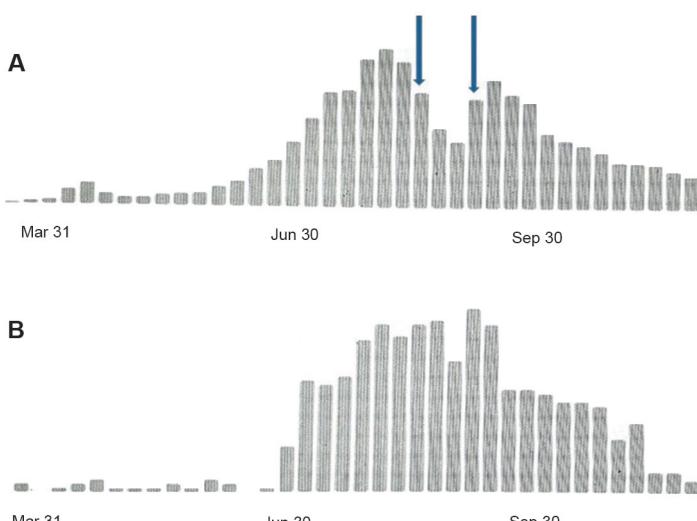
В соответствии с указом Президента Республики Узбекистан на базе амбулаторно-поликлинических учреждений (центральных многопрофильных поликлиник, сельских врачебных пунктов, сельских семейных поликлиник), районных, городских и областных центров санитарно-эпидемиологического благополучия (СЭБ) созданы мобильные группы (бригады), состоящие из врача общей практики, инфекциониста, эпидемиолога и специалиста дезинфекционного профиля. Эти группы предназначены для выявления больных с вероятным COVID-19, определения необходимости госпитализации или возможности проведения амбулаторного лечения, выявления контактных лиц и наблюдения за ними, забора биологического материала для лабораторной диагностики, проведения эпидрасследования и дезинфекционных мероприятий. Ограничение контактов, активная диагностика и терапия, изоляция контактных и болеющих наряду с применением средств защиты и дезинфекции являются общепризнанными мероприятиями, которые должны обеспечить контроль над эпидемической ситуацией [1–3].

Несмотря на предпринятые меры, в летние месяцы неблагоприятная эпидемическая ситуация сохранилась, что стало причиной для обращения за помощью к РФ.

Цель работы – определить основные причины распространения COVID-19 в Республике Узбекистан и разработать план мероприятий для снижения заболеваемости коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Проанализирована организация работы в 14 учреждениях здравоохранения Ташкента и Самарканда, а также Ташкентской и Самаркандской областей:



Динамика роста числа инфицированных лиц (A) и летальных исходов (B) в Республике Узбекистан за период с июня по сентябрь 2020 г. по данным ВОЗ [11] (стрелками отмечены начало и завершение работы специалистов Роспотребнадзора)

The dynamics of the increment in the number of infected persons (A) and deaths (B) in the Republic of Uzbekistan for the period of June-September, 2020 according to the WHO [11] (arrows indicate the start and end of the work of Rospotrebnadzor specialists)

в 7 лабораториях, 6 стационарах и 1 поликлинике. Изучены маршруты перемещения персонала, разграничение зеленых и красных зон, особенности дезинфекции и использование средств индивидуальной защиты. Обращено внимание на диагностику COVID-19, применение терапии, направленной на сокращение периода вирусовыделения, критерии снятия карантинных ограничений для пациентов. Оценены возможности, оборудование, организация и условия работы медицинского персонала в лабораториях, осуществляющих диагностику методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), организованных на базе центров СЭБ, в Республиканском центре профилактики чумы, Республиканском центре СПИД, ЦСЭН Министерства обороны и МВД, НИИ вирусологии, НИИ эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний, НИИ педиатрии.

Результаты и обсуждение

В ходе работы выявлены основные причины, ведущие к распространению инфекции среди населения и способствующие росту числа тяжелых и крайне тяжелых форм, случаев затяжного течения, длительного пребывания в стационаре.

Одной из ведущих причин являлось отсутствие оборудованных шлюзов между красной и зеленой зонами для безопасного снятия средств индивидуальной защиты (СИЗ) медицинским персоналом с возможностью полноценной дезинфекции. Недостаточное количество дезинфицирующих средств, небольшой объем емкостей для дезинфекции, а в некоторых учреждениях их отсутствие, наряду с отсутствием оборудования для обеззараживания воздуха, очевидно, могли способствовать наличию в этих помещениях большого количества вируса. В некоторых стационарах и лабораториях не было четкого разделения на красную и зеленую зоны, что становилось причиной перемещения медицинского персонала без дезинфекции в отделения, где сотрудники не использовали СИЗ. Обычный рабочий график с отдыхом медперсонала по месту постоянного проживания, в том числе с родственниками, создавал условия для распространения COVID-19. В ряде стационаров не было предусмотрено отдельных площадок для дезинфицирующей обработки транспорта. Проведение дезинфекции автомобилей вне специально выделенных мест приводило к контактированию медицинского персонала, выходящего из зеленых зон, с лицами, сопровождавшими пациентов.

Другой очевидной причиной был неправильный выбор СИЗ: использование костюмов, не соответствующих требованиям по безопасности и классу защиты, из материалов, не обеспечивающих изоляцию кожных покровов, нередко – отсутствие защиты глаз, неплотное прилегание респираторов и масок. Отмечено применение респираторов с клапаном выдоха при наличии симптомов респираторной инфекции медперсоналом. В то же время сотрудники, ко-

торые уже ранее болели коронавирусной инфекцией, гораздо чаще не использовали необходимые СИЗ. При этом после контактов с пациентами персонал учреждений может становиться источником инфекции с возможной передачей контактным путем за счет присутствия вируса на одежде, волосах, коже, а также в результате повторных эпизодов вирусовыделения, в том числе в случаях повторного заражения, которые к настоящему моменту не исключены.

Третьей возможной причиной распространения COVID-19 были наблюдение и изоляция контактных лиц в течение 10 дней, так как риск развития заболевания на 11–14-е сутки от момента контакта с больным достаточно высок [4, 5]. К росту заболеваемости могла приводить и выписка пациентов из стационаров на основании клинического улучшения, без получения результатов диагностики методом ПЦР, с дальнейшим отсутствием контроля и каких-либо ограничений в передвижениях и контактах для этих больных [6–8]. При посещении стационаров обращено внимание на то, что часть пациентов госпитализирована с COVID-19 повторно. В то же время при диагнозе «внебольничная пневмония» лабораторная диагностика на наличие вируса SARS-CoV-2 проводилась лишь в некоторых случаях, а госпитализация таких пациентов осуществлялась в переоборудованные помещения, рассчитанные на 400–500 человек, без изоляции между отсеками, с общими коридорами и общим подпотолочным пространством.

Немаловажным фактором, способствующим распространению инфекции, могло быть неверное применение схем противовирусной терапии, что приводило к продолжительному периоду вирусовыделения пациентами, достигающему 3–4 недель и более, что зафиксировано в ряде историй болезней.

В целом большинство из выявленных причин легко устраниТЬ на местах без существенных дополнительных экономических затрат. Безусловно, в переоборудованных стационарах наибольшие технические сложности возникли в связи с организацией шлюзов между красной и зеленой зонами. Однако, как показал опыт, для этой проблемы решение могло быть найдено во всех случаях. Наиболее сложным представлялось обеспечение лабораторий дополнительным оборудованием и специалистами по диагностике методом ПЦР, обученными правилам работы с возбудителями II группы патогенности. Полученные результаты суммированы в таблице.

Анализ ситуации показал несоблюдение требований биологической безопасности в стационарных объектах, переоборудованных для лечения новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2. В связи с этим для рассмотрения и обсуждения сформулированы следующие предложения:

1. Обеспечить соблюдение требований биологической безопасности с целью снижения риска инфицирования персонала стационаров и лабораторий, проводящих исследования на COVID-19. Для этого необходимо провести зонирование и соз-

Выявленные в медицинских учреждениях Республики Узбекистан причины, способствующие распространению COVID-19, и мероприятия для их устранения

Factors that contribute to the spread of COVID-19, identified in hospitals of the Republic of Uzbekistan and measures to eliminate them

№ п/п	Причины распространения COVID-19 Causes of COVID-19 spread	Мероприятия по устраниению причин Measures to eliminate the driving forces
1	Отсутствие оборудованных шлюзов для безопасного снятия СИЗ медперсоналом с возможностью полноценной дезинфекции Lack of equipped airlocks for safe removal of personal protective equipment by medical personnel with the possibility of full-fledged disinfection	Зонирование и оборудование отдельных помещений с достаточным количеством и объемом емкостей с дезинфицирующими средствами, установка оборудования для дезинфекции персонала жидкими дезсредствами. Установка оборудования для обеззараживания воздуха (рециркуляторы). Маркировка и полноцветная изоляция красных и зеленых зон Demarcation and equipping of premises with a sufficient number and volume of containers with disinfectants, installation of equipment for disinfection of personnel with liquid disinfectants. Installation of modules for air disinfection (recirculators). Labeling and complete isolation of the red and green zones
2	Отсутствие специальных площадок для дезинфекции транспорта Lack of special platforms for disinfection of transport	Выделение и оборудование специальных изолированных площадок Allocation and equipment of special isolated sites
3	Неправильный выбор СИЗ Incorrect PPE selection	Обеспечение одноразовыми (возможно, многоразовыми) СИЗ необходимого класса защиты: костюмы/комбинезоны класса 5/6, респираторы FFP2 или FFP3, противочумные костюмы 1-го типа Providing disposable (possibly reusable) PPE of the required protection class: suits/overalls of class 5/6, FFP2 or FFP3 respirators, type 1 anti-plague suits
4	Отсутствие СИЗ у некоторых медработников в красных зонах Lack of PPE for some health workers in red zones	Обучение медперсонала Training of medical staff
5	Перемещение из красной зоны в зеленую без использования шлюза, снятия и дезинфекции использовавшихся СИЗ Moving from the red zone to the green zone without using a gateway, removing and disinfecting used PPE	Маркировка зон, обучение медперсонала Marking of zones, training of medical staff
6	Выписка пациентов из стационаров на основании клинического улучшения Discharge of patients from hospitals based on clinical improvement	Увеличение числа оборудования для ПЦР-диагностики в новых стационарах, обучение персонала The increase in the number of equipment for PCR-diagnostics in new hospitals, training of staff
7	Изоляция и наблюдение за контактными лицами в течение 10 дней Isolation and monitoring of contact persons for 10 days	Увеличение срока изоляции и наблюдения в соответствии с рекомендацией ВОЗ (на основании продолжительности инкубационного периода до 14 дней) Increased isolation and follow-up period in accordance with the WHO recommendation (based on the duration of the incubation period of up to 14 days)
8	Госпитализация пациентов с пневмониями и симптомами респираторной инфекции без подтверждения наличия вируса SARS-CoV-2 в переоборудованные помещения без изоляции от других больных Hospitalization of patients with pneumonia and symptoms of respiratory infection without confirmation of the presence of the SARS-CoV-2 virus in converted rooms without isolation from other patients	Выделение провизорных отделений The allocation of provisional facilities
9	Неправильное применение противовирусной терапии Absence or incorrect use of antiviral therapy	Обучение врачей, коррекция рекомендаций и протоколов в соответствии с результатами проведенных исследований Training of doctors, amendment of recommendations and protocols in accordance with the results of research conducted

дать условия для адекватной дезинфекции на выходе из отделений и корпусов (дезинфекционные тоннели) с контролем за их состоянием, а также оборудованные шлюзы для снятия и дезинфекции СИЗ с контролем за наполнением и своевременной заменой пакетов для отходов класса В, дезинфекцией воздуха с помощью обеззаражающих рециркуляторов. Обеспечить наличие маркировок грязных и чистых зон, а также используемых емкостей с информацией о средствах, находящихся в них. Организовать поточность движения персонала, поступающего на исследование материала, проведение этапа разбора и первичной подготовки проб в боксах микробиологической безопасности, обеззараживание стоков, безопасное обращение с отходами. Обратить внимание на возможность контроля защитной эффективности фильтров очистки воздуха, установленных в системах приточно-вытяжной вентиляции и боксах микробиологической безопас-

ности инфекционных стационаров и лабораторий. Выделить площадки для дезинфекционной обработки санитарного транспорта.

2. Обеспечить персонал средствами индивидуальной защиты необходимого уровня (костюмы/комбинезоны класса 5/6, респираторы FFP2/3, защита глаз), в том числе и для лиц с перенесенным COVID-19. Провести обучение по необходимости и правилам применения СИЗ.

3. Пересмотреть сроки наблюдения и обследования для больных, контактных, лиц под медицинским наблюдением в карантинных зонах, которые должны составлять не менее 14 дней с двукратным обследованием, начиная с 10-го дня, при появлении симптомов, не исключающих COVID-19, – немедленно. Выделить провизорные отделения. Выписку из стационаров проводить при условии клинического выздоровления и получения двух отрицательных ре-

зультатов ПЦР (с интервалом не менее суток). В случае выписки ранее этого по каким-либо причинам необходимо изолировать пациента на дому до наличия двух последовательно взятых мазков, подтверждающих элиминацию вируса. Обеспечить возможность выявления вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР в мазках из зева и носоглотки (при необходимости, дополнительно – в мокроте, бронхоальвеолярных смывах и другом биоматериале) для всего контингента, подлежащего обследованию. Для этого необходимо увеличение количества оборудования и специалистов по лабораторной диагностике, обученных правилам работы с возбудителями II группы патогенности. При этом рекомендовано учесть необходимость дифференциальной диагностики коронавирусной инфекции с гриппом, другими инфекциями с воздушно-капельным путем передачи, в том числе туберкулезом, а также с онкологической патологией, другими заболеваниями. Обязательно проводить обследование на наличие вируса SARS-CoV-2 лиц с диагнозом «внебольничная пневмония», в очагах групповой заболеваемости респираторными инфекциями, медицинских работников – один раз в 7–10 дней.

4. Схемы противовирусной терапии привести в соответствие с имеющимися рекомендациями, в том числе основанными на результатах проведенных рандомизированных многоцентровых исследований [9]. Обеспечить достаточное количество эффективных противовирусных препаратов (фавипиравира, ремдесивира).

5. Обеспечить обучение и контроль уровня знаний по противоэпидемическим, диагностическим, терапевтическим, а также профилактическим подходам при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 [10].

Для успешной реализации каждого из пунктов были проведены конференции и совещания, на которых представлены объяснения необходимости принятия соответствующих мер, даны ответы на многочисленные вопросы.

Внедрение целенаправленных мер в дополнение к ранее принятым привело к значительному улучшению эпидемической ситуации.

Очевидно, что в результате несоблюдения принципов биологической безопасности в медицинских учреждениях персонал может становиться источником инфицирования для большого числа людей. В связи с этим крайне важно обеспечить безопасность работы медперсонала с помощью СИЗ, соответствующий характеру выполняемых работ, зонирования с выделением оборудованных шлюзов для снятия и дезинфекции СИЗ. Благоприятное влияние на эпидемическую ситуацию может оказывать введение периода изоляции контактных лиц не менее чем на 14 дней, до двукратного получения отрицательного результата анализа на вирус SARS-CoV-2. Использование эффективных схем противовирусной терапии приводит к сокращению продолжительности выделения вируса пациентом, что снижает время возможной переда-

чи возбудителя. После введения рассмотренных мер число активных случаев в Республике Узбекистан, несмотря на увеличение объемов тестирования, снизилось с 3686 человек на 23 августа до 2335 на 27 октября 2020 г. на фоне роста в соседних странах (рисунок) [11]. Продолжительность пребывания пациентов в стационарах и число занятых коек сократилось, что было подтверждено закрытием всех диагностических распределительных центров в Республике Узбекистан по причине отсутствия пациентов с COVID-19, большинство ранее перепрофилированных для больных коронавирусной инфекцией медицинских учреждений страны вернулись к обычному режиму работы. К 20 декабря 2020 г. 97 % заболевших полностью выздоровели.

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

Список литературы

1. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Сафонов В.А., Карнаухов И.Г., Иванова А.В., Щербакова С.А. Эпидемиологические особенности новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Сообщение 2: особенности течения эпидемического процесса COVID-19 во взаимосвязи с проводимыми противоэпидемическими мероприятиями в мире и Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:6–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-6-12.
2. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Сафонов В.А., Карнаухов И.Г., Иванова А.В., Щербакова С.А. Эпидемиологические особенности новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Сообщение 1: Модели реализаций профилактических и противоэпидемических мероприятий. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:6–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-6-13.
3. Сайдалиев С.С., Мирзабаев Д.С., Мадаминов М.М. Опыт борьбы с коронавирусной инфекцией в Республике Узбекистан. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:138–140. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-138-140.
4. Li W., Zhang B., Lu J., Liu S., Chang Z., Peng C., Liu X., Zhang P., Ling Y., Tao K., Chen J. Characteristics of household transmission of COVID-19. *Clin. Inf. Dis.* 2020; 71(8):1943–6. DOI: 10.1093/cid/ciaa450.
5. Levy C., Basmaç R., Bensaid P., Bru C.B., Coinde E., Dessiouxe E., Fournial C., Gashignard J., Haas H., Hentgen V., Huett F., Lalande M., Martinot A., Pons C., Romain A.S., Ursulescu N., Le Sage F.V., Raymond J., Béchet S., Toubiana J., Cohen R. Changes in Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction-positive Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Rates in Adults and Children According to the Epidemic Stages. *Pediatr. Infect. Dis.* J. 2020; 39(11):e369–72. DOI: 10.1097/INF.00000000000002861.
6. 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., Guðmundsson K.R., Gunnarsdottir T.R., Gylfason A., Holm H., Jansson 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., Thordbjornsson 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.
7. Contact tracing in the context of COVID-19. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/contact-tracing-in-the-context-of-covid-19> (дата обращения 01.03.2021).
8. Macartney K., Quinn H.E., Pillsbury A.J., Koirala A., Deng L., Winkler N., Katalaris A.L., O'Sullivan M.V.N., Dalton C., Wood N.; NSW COVID-19 Schools Study Team. Transmission of SARS-CoV-2 in Australian educational settings: a prospective cohort study. *Lancet Child Adolesc. Health.* 2020; 4(11):807–16. DOI: 10.1016/S2352-4642(20)30251-0.
9. Временные методические рекомендации профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 7 (03.06.2020). [Электронный ресурс]. URL: https://static-0.rosminzdrav.ru/system/attachments/attachments/000/050/584/original/03062020_%D0%9CR_COVID-19_v7.pdf (дата обращения 25.09.2020).
10. Руженцова Т.А., Чухляев П.В., Хавкина Д.А., Гарбузов А.А., Плоскирева А.А., Осепшиюк Р.А., Солуянова Т.Н.,

Шестакова И.В., Вафин А.Ю., Дмитрикова Е.П., Мустафаев Д.М., Домостроева Т.Н., Отпущенникова М.В., Покровский К.А., Рusanova M.G., Быстрицкий Д.А., Маркова Т.Н., Каплун Е.А., Петина Д.В., Костина Н.Е., Лесина В.С., Щербак С.Г., Агафына А.С., Брук Ю.Ф., Бронов О.Ю., Шульц Е.И., Красавина Э.Н., Самсонов М.Ю., Зинченко А.В., Никольская М.В., Разживина В.А., Филон О.В. Эффективность и безопасность применения фавипиравира в комплексной терапии COVID-19 легкого и среднетяжелого течения. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2020; 4(9):8–19. DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-0-0-0.

11. Emergency Dashboard WHO (COVID-19). [Электронный ресурс]. URL: <https://covid19.who.int/region/euro/country/uz> (дата обращения 25.09.2020).

References

- Kutyrayev V.V., Popova A.Yu., Smolensky V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Safronov V.A., Karnauchov I.G., Ivanova A.V., Shcherbakova S.A. [Epidemiological peculiarities of new coronavirus infection (COVID-2019). Communication 2: Peculiarities of epidemic process development in conjunction with performed anti-epidemic measures around the world and in the Russian Federation]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):6-12. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-6-12.
 - Kutyrayev V.V., Popova A.Yu., Smolensky V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Safronov V.A., Karnauchov I.G., Ivanova A.V., Shcherbakova S.A. [Epidemiological features of new coronavirus infection (COVID-19). Communication 1: Modes of Implementation of Preventive and Anti-Epidemic Measures]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):6-13. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-6-13.
 - Saidaliev S.S., Mirzabaev D.S., Madaminov M.M. [Lessons learned from fighting coronavirus disease in the Republic of Uzbekistan]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):138-40. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-138-140.
 - Li W., Zhang B., Lu J., Liu S., Chang Z., Peng C., Liu X., Zhang P., Ling Y., Tao K., Chen J. Characteristics of household transmission of COVID-19. *Clin. Inf. Dis.* 2020; 71(8):1943-6. DOI: 10.1093/cid/ciaa450.
 - Levy C., Basmaci R., Bensaid P., Bru C.B., Coinde E., Dessoux E., Fournial C., Gashignard J., Haas H., Hentgen V., Huett F., Lalande M., Martinot A., Pons C., Romain A.S., Ursulescu N., Le Sage F.V., Raymond J., Bechet S., Toubiana J., Cohen R. Changes in Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction-positive Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Rates in Adults and Children According to the Epidemic Stages. *Pediatr. Infect. Dis.* 2020; 39(11):e369-72. DOI: 10.1097/INF.0000000000002861.
 - 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., Jansson B.O., Jonasdottir A., Jonsson F., Josefsson 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., Guðnason 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.
 - Contact tracing in the context of COVID-19. (Cited 01 Mar 2021). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/publications/item/contact-tracing-in-the-context-of-covid-19>.
 - Macartney K., Quinn H.E., Pillsbury A.J., Koiralai A., Deng L., Winkler N., Katelaris A.L., O'Sullivan M.V.N., Dalton C., Wood N.; NSW COVID-19 Schools Study Team. Transmission of SARS-CoV-2 in Australian educational settings: a prospective cohort study. *Lancet Child Adolesc. Health.* 2020; 4(11):807-16. DOI: 10.1016/S2352-4642(20)30251-0.
 - [Interim guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of novel coronavirus infection (COVID-19)]. Version 7 (06/03/2020). (Cited 25 Sept 2020). [Internet]. Available from: https://static-0.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/584/original/03062020_%D0%9CR_COVID-19_v7.pdf.
 - Ruzhentsova T.A., Chukhlyayev P.V., Khavkina D.A., Garbusov A.A., Ploskireva A.A., Oseshmyuk R.A., Soluyanova T.N., Shestakova I.V., Vafin A.Yu., Dmitrikova E.P., Mustafaev D.M., Domostroeva T.N., Otpushchennikova M.V., Pokrovsky K.A., Rusanova M.G., Bystritsky D.A., Markova T.N., Kaplun E.A., Petina D.V., Kostina N.E., Lesina V.S., Shcherbak S.G., Agaf'ina A.S., Bruk Yu.F., Bronov O.Yu., Shultz E.I., Krasavina E.N., Samsonov M.Yu., Zinchenko A.V., Nikol'skaya M.V., Razzhivina V.A., Filon O.V. [Efficacy and safety of favipiravir in a complex therapy of mild to moderate COVID-19]. *Infektionsnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2020; 4(9):26-38. DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-00-0.
 - Emergency Dashboard WHO (COVID-19). (Cited 25 Sept 2020). [Internet]. Available from: <https://covid19.who.int/region/euro/country/uz>.

Authors:

Author's:
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.

Ruzhentsova T.A., Khavkina D.A., Chukhlyayev P.V. Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.N. Gabrichesky. 10, Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russian Federation. E-mail: ruzhencova@gmail.com, havkina@gmail.com, pafachka@gmail.com.

Tuychiev L.N., Akhmedova M.D., Eraliev U.E., Rakhamtullaeva Sh.B. Tashkent Medical Academy, 2, Farobi St., Tashkent, 100109, Republic of Uzbekistan. E-mail: laziz.tuychiev@tma.uz; tmainfection@mail.ru; umid.eralieva@tma.uz; doctor_shakhnoza@mail.ru.

Madazimov M.M. Andijan State Medical Institute. 1,
Yu. Atabekova St., Andijan, 170128, Republic of Uzbekistan. E-mail:
komil-madazimov@inbox.ru.

Kholmatova K.Sh., Abdulkhalilova G.K. Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Epidemiology, Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases. 2, Zakovat St., Tashkent, 100151, Republic of Uzbekistan. E-mail: kamola-hol@yandex.ru; gula-abd@yandex.ru.

Kedrova O.V., Sharova I.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Smelyansky V.P. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd 4400131, Russian Federation. E-mail:

Golubinskaya St., volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@spint-v.com.ru.
Scriabina S.V. Rospotrebnadzor Administration in the Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russian Federation. 3, Otdel'ny Lane, Yekaterinburg, 620078, Russian Federation. E-mail: skrvabina_sv@66.rosпотребнадзор.ru

02/00/7, Russian Federation. E-mail: skryabina_sv@ob.rosptorenbazoz.ru.
Akhmedov U.B. Republican Specialized Scientific and Practical Center for Surgery named after V. Vokhidov. 10/1, Small ring road, Tashkent, 100115, Republic of Uzbekistan. E-mail: makesha71@mail.ru

100113, Republic of Uzbekistan. E-mail: makesha1@mail.ru.
Garibov A.A., Akimkin V.G. Central Research Institute of Epidemiology. 3A, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russian Federation. E-mail: crie@nrc.ru

Akbarov T.Yu. Children's City Infectious Diseases Hospital No. 2, 4, Aviasozilar St., Tashkent, 100040, Republic of Uzbekistan. E-mail: dr.timakbarov@mail.ru

Zhanibekov Zh.Zh. Republican Children's Infectious Diseases Hospital of the Republic of Karakalpakstan. 33, K. Ayimbetova St., Nukus, Republic of Karakalpakstan, 230100, Republic of Uzbekistan. E-mail: janibekov3001@gmail.com.

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. Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования; Российская Федерация, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.

Руженцова Т.А., Хавкина Д.А., Чухляев П.В. Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского. Российская Федерация, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10. E-mail: ruzhencova@gmail.com, havkina@gmail.com, pafachka@gmail.com.

Түчіев Л.Н., Ахмедова М.Д., Эралиев У.Э., Рахматуллаева Ш.Б. Ташкентская медицинская академия. Республика Узбекистан, 100109, Ташкент, ул. Фаробий, 2. E-mail: laziz.tuchieyev@mail.uz; tmainfection@mail.ru; umid.eraliiev@mail.uz; doctor_shakhnoza@mail.ru.

Мадазимов М.М. Андижанский государственный медицинский институт. Республика Узбекистан, 170128, Андижан, ул. Ю. Атабекова, 1. E-mail: komil-madazimov@inbox.ru.

Холматова К.Ш., Абдухалиева Г.К. Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний. Республика Узбекистан, 100151, Ташкент, ул. Заковат, 2. E-mail: khamola_b@mail.ru; gule_kab@mail.ru

кamola-hol@yandex.ru; gula-abd@yandex.ru.
Кедрова О.В., Шарова И.Н. Российский научно-исследовательский противочумочный институт «Микроби». Российской Федерации, 410005, Самара, пр. Университетский, 46. E-mail: tuctopri@mail.ru

Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.
Смелянский В.П. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российской Федерации, 400131, Волгоград, ул. Гоголевская, 7. E-mail: var2@crxpt.vcom.ru

ул. Голубинская, 7. E-mail: variz@sprint-v.com.ru.
Скрябина С.В. Управление Роспотребнадзора по Свердловской области. Российской Федерации, 620078, Екатеринбург, пер. Отдельный, 3. E-mail: skryabina_sv@66.rosпотребнадзор.ru

Е-mail: skryabina_sv@bk.ru
Ахмедов У.Б. Республиканский специализированный научно-практический центр хирургии им. В. Вохидова. Республика Узбекистан, 100115, Ташкент, Малая кольцевая дорога, 10/1. Е-mail: makesha71@mail.ru.

Гарбузов А.А., Акимкин В.Г. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. Российская Федерация, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3А. E-mail: crie@pcr.ru.

Акбаров Т.Ю. Детская городская инфекционная больница № 2. Республика Узбекистан, 100040, Ташкент, ул. Авиасозлар, 4. E-mail: dr.timakbarov@mail.ru.

Жанибеков Ж.Ж. Республика Каракалпакстан. Республика Узбекистан, 230100, Республика Каракалпакстан, Нукус, ул. К. Аймбетова, 33. E-mail: janibekov3001@gmail.com.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-129-133

УДК 616.98:579.834.114(571.1/.5)

Н.Л. Тупота, В.А. Терновой, М.Ю. Карташов, Е.П. Пономарева, В.Б. Локтев**ДЕТЕКЦИЯ *BORRELIA MIYAMOTOI* В ИКСОДОВЫХ КЛЕЩАХ,
СОБРАННЫХ НА ЮГЕ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ***ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово,
Российская Федерация*

Цель работы – оценить уровень инфицированности *Borrelia miyamotoi* клещей *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi*, собранных на юге Западной Сибири. **Материалы и методы.** Исследованы 688 клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, собранных на территории Новосибирской, Томской и Кемеровской областей. ДНК боррелий выявлены методом двухраундовой полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами к участку гена *omp66* с последующим секвенированием выделенных фрагментов и проведением филогенетического анализа, включая последовательности прототипных изолятов, опубликованных в международной базе данных GenBank. Сравнение и анализ нуклеотидных последовательностей выполняли с использованием пакета программ MEGA 7. Параллельно методами ОТ-ПЦР и ПЦР с использованием видоспецифических и родоспецифических праймеров проведено исследование образцов на наличие возбудителей трансмиссивных инфекций: лихорадки Западного Нила и клещевого энцефалита, анаплазмоза, эрлихиоза, бабезиоза, bartonelлеза и кандидатных возбудителей клещевых риккетсиозов. **Результаты и обсуждение.** Генетический материал *B. miyamotoi* выявлен в 2,2 % клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* в Томской, Новосибирской и Кемеровской областях, определена их принадлежность к азиатскому генотипу. Установлено, что степень сходства фрагментов гена *omp66* внутри группы, объединяющей изолятами азиатского генотипа, составила 100 %. Взаимосвязь *B. miyamotoi* с определенным видом переносчика не обнаружена.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, *Borrelia miyamotoi*, генотипирование.

Корреспондирующий автор: Тупота Наталья Леонидовна, e-mail: tupota_nl@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Тупота Н.Л., Терновой В.А., Карташов М.Ю., Пономарева Е.П., Локтев В.Б. Детекция *Borrelia miyamotoi* в иксодовых клещах, собранных на юге Западной Сибири. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 3:129–133. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-129-133.

Поступила 09.07.2020. **Отправлена на доработку** 15.09.2020. **Принята к публ.** 18.09.2020.

N.L. Tupota, V.A. Ternovoy, M.Yu. Kartashov, E.P. Ponomareva, V.B. Loktev

Detection of *Borrelia miyamotoi* in Ixodidae Ticks Collected in the South of Western Siberia

State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to assess the level of infection with *Borrelia miyamotoi* in ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* collected in the south of Western Siberia. **Materials and methods.** 688 ticks *I. persulcatus* and *I. pavlovskyi* collected on the territory of Novosibirsk, Tomsk and Kemerovo Regions were examined. *Borrelia* DNA was detected by a two-round polymerase chain reaction with specific primers to the *omp66* gene region, followed by sequencing of the isolated fragments and phylogenetic analysis, including the sequences of prototype isolates published in the international GenBank database. Comparison and analysis of nucleotide sequences was carried out using the MEGA 7 software package. In parallel, the samples were examined for the presence of the agents of transmissible infections – West Nile fever and tick-borne encephalitis, anaplasmosis, ehrlichiosis, babesiosis, bartonellosis and candidate pathogens of tick-borne rickettsiosis through RT-PCR and PCR with species-specific and genus-specific primers. **Results and discussion.** The genetic material of *B. miyamotoi* was found in 2.2 % of *I. persulcatus* and *I. pavlovskyi* ticks in the Tomsk, Novosibirsk, and Kemerovo Regions and their appurtenance to the Asian genotype was determined. It was revealed that the degree of similarity of the *omp66* gene fragments within the group of isolates of the Asian genotype was 100 %. No relation between *B. miyamotoi* and a specific vector species was identified.

Key words: Ixodidae tick-borne borreliosis, *Borrelia miyamotoi*, genotyping.

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

Corresponding author: Natalia L. Tupota, e-mail: tupota_nl@vector.nsc.ru.

Citation: Tupota N.L., Ternovoy V.A., Kartashov M.Yu., Ponomareva E.P., Loktev V.B. Detection of *Borrelia miyamotoi* in Ixodidae Ticks Collected in the South of Western Siberia. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:129–133. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-129-133.

Received 09.07.2020. **Revised** 15.09.2020. **Accepted** 18.09.2020.

Tupota N.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6150-370X>
Ternovoy V.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1275-171X>
Kartashov M.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Ponomareva E.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8237-457X>
Loktev V.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – природно-очаговые трансмиссивные заболевания, возбудители которых выявляются в иксодовых клещах Евразии и Северной Америки [1]. Заражение

человека происходит трансмиссивным путем после укуса клеща. Этиология части безэритеческих форм иксодового клещевого боррелиоза связана с *Borrelia miyamotoi*, генетически относимыми к воз-

будителям клещевых возвратных лихорадок и распространенными на значительной территории земного шара [1–7]. Относительно недавно было показано, что *B. miyamotoi* способна вызывать тяжелые заболевания, включая менингоэнцефалит у людей с ослабленным иммунитетом, и микст-инфекции с другими возбудителями клещевых инфекций [8–11]. Инфицированность иксодовых клещей *B. miyamotoi* значительно ниже, чем боррелиями комплекса *B. burgdorferi* s.l. На территории Польши этот показатель составляет от 14 % для *B. burgdorferi* s.l. до 0,3 % для *B. miyamotoi*, в Германии – 9,4 и 1,2 %, в Испании – 11,84 и 0,85 % соответственно [12–14]. В разных регионах России этот показатель варьируется от 0,5 до 16 % [15–18].

Цель – оценить уровень инфицированности *B. miyamotoi* клещей *Ixodes persulcatus* и *I. pavlovskyi*, собранных на юге Западной Сибири.

Материалы и методы

В исследование взято 688 клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, из которых 271 сняли с людей, 417 клещей собрали на флаг в Новосибирской, Томской и Кемеровской областях в мае–июне 2017–2018 гг. Принадлежность исследуемых клещей к виду *Ixodes* устанавливали морфологически с последующим определением нуклеотидной последовательности фрагмента митохондриального гена цитохромоксидазы COI. Гомогенизацию образцов осуществляли в 300 мкл фосфатно-солевого буфера. Выделение нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл гомогената с использованием набора «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) согласно инструкции производителя. ДНК боррелий выявляли методом двухраундовой полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами к участку гена *ompB6* с последующим секвенированием выделенных фрагментов и проведением филогенетического анализа [18]. Параллельно методами ОТ-ПЦР и ПЦР проведено исследование образцов с видоспецифическими и родоспецифическими праймерами, описанными ранее [19], на наличие возбудителей клещевых инфекций: вирусов Западного Нила (ВЗН) и клещевого энцефалита (ВКЭ), анаплазмоза (*Anaplasma* spp.), эрлихиоза (*Ehrlichia* spp.), бабезиоза (*Babesia* spp.), бартонеллеза (*Bartonella* spp.) и кандидатных возбудителей клещевых риккетсиозов (*Rickettsia* spp.). Определение нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации проводили на автоматическом секвенаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems, США), используя набор реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), согласно инструкции производителя. При проведении филогенетического анализа для сравнения использовали последовательности прототипных изолятов, опубликованных в международной базе данных GenBank. Сравнение и анализ нуклеотидных последовательностей

выполняли с использованием пакета программ MEGA 7. Нуклеотидные последовательности фрагмента гена *ompB6* длиной 574 п.н. были секвенированы и депонированы в базу данных GenBank (MN689812 – MN689814, MN181500, MN181501, MN986989, MN986990, MN994870, MN994871, MT185687, MT185688).

Результаты и обсуждение

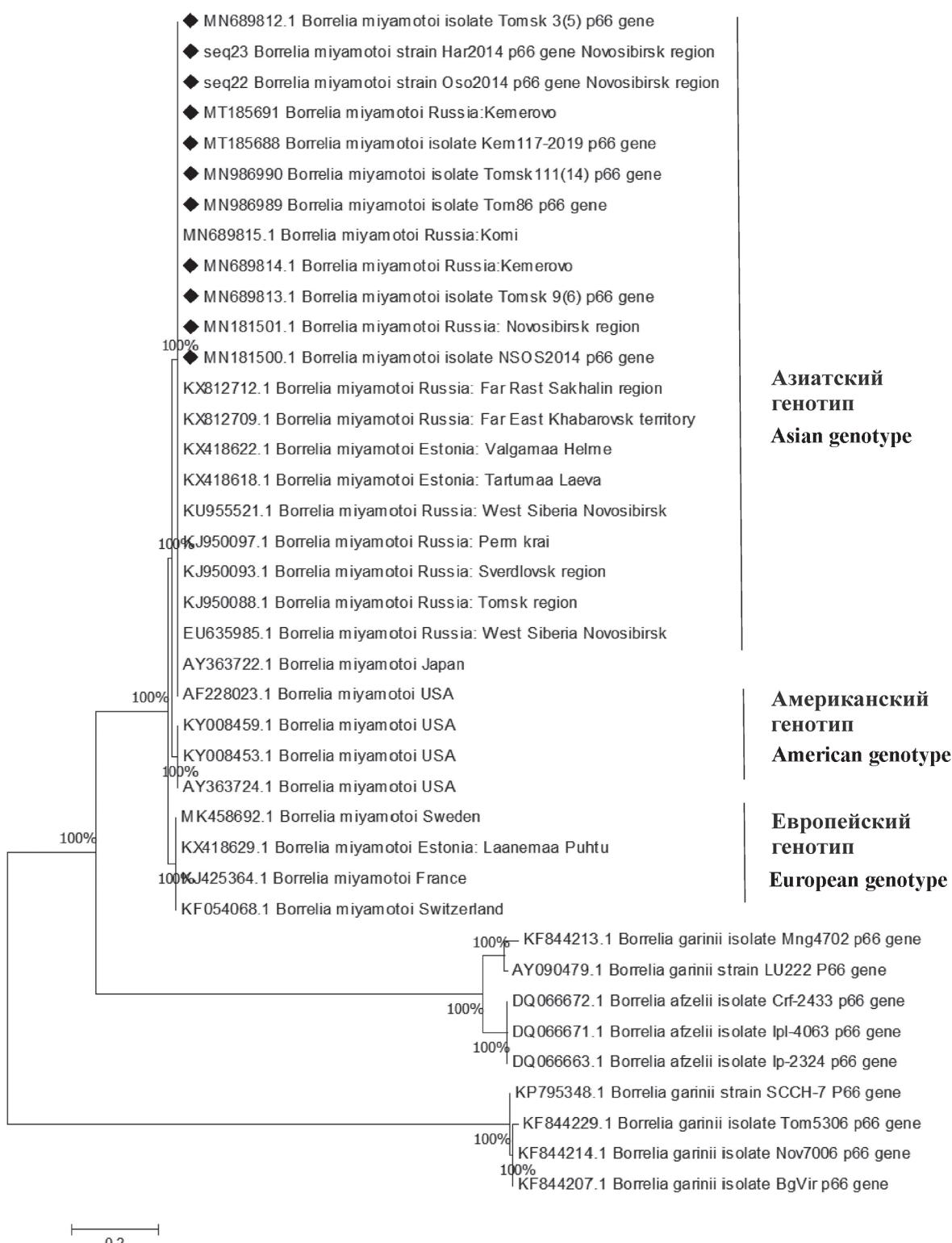
Генетический материал *B. miyamotoi* обнаружен у 15 (2,2 %) особей из 688 клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, собранных в Новосибирской, Томской и Кемеровской областях. Филогенетический анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей гена *ompB6* показал, что идентифицированные изоляты относятся к азиатскому генотипу *B. miyamotoi*. Идентичные последовательности гена *ompB6* были получены ранее при анализе генетического материала *B. miyamotoi*, выявленного как в клинических образцах, так и в суспензиях иксодовых клещей в Новосибирске, Екатеринбурге, Южно-Сахалинске, Биробиджане и Хабаровске (рисунок).

При этом внутри группы, объединяющей изоляты азиатского генотипа, отсутствовала гетерогенность, степень сходства фрагментов гена *ompB6* составила 100 %. Изоляты, относящиеся к американскому и европейскому генотипу, на исследуемой территории и в данной выборке не обнаружены.

В ходе нашего исследования не обнаружена взаимосвязь *B. miyamotoi* с определенным видом переносчика: пять изолятов получены из *I. pavlovskyi*, семь – из *I. persulcatus*. Взаимосвязь уровня инфицированности с объектом обнаружения клеща (человек или флаг) также не выявлено.

Известно, что у иксодовых клещей нередко встречаются микст-инфекции, ассоциированные с различными инфекционными агентами [20–22] и оказывающие влияние на течение и клиническое проявление заболевания. Однако в ходе нашей работы в клещах, инфицированных *B. miyamotoi*, мы не обнаружили генетических маркеров других возбудителей трансмиссивных инфекций: *B. afzelii*, *B. garinii*, *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp. и вируса клещевого энцефалита.

Таким образом, нами выполнена детекция генетических маркеров *B. miyamotoi* в двух видах иксодовых клещей, собранных на юге Западной Сибири в течение 2017–2018 гг. Генетический материал *B. miyamotoi* выявлен в 2,2 % клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* в Томской, Новосибирской и Кемеровской областях. Генотипирование выделенных изолятов по нуклеотидной последовательности фрагмента гена *ompB6* показало, что на юге Западной Сибири циркулируют изоляты азиатского генотипа *B. miyamotoi*. Ассоциация данного возбудителя с безэрitemными формами боррелиоза у человека требует совершенствования диагностики этой клещевой инфекции на юге Западной Сибири.



Филогенетическое древо *B. miyamotoi*, построенное на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *omp66* с помощью метода максимального правдоподобия, содержит внешнюю группу сравнения, представленную *B. garinii* и *B. afzelii*. На рисунке показаны изученные изолятами, депонированные в GenBank

Phylogenetic tree of *B. miyamotoi* constructed on the basis of nucleotide sequences of the *omp66* gene fragment using the maximum likelihood method. It contains an external comparison group represented by *B. garinii* and *B. afzelii*. The figure shows the studied isolates deposited in the GenBank

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

Список литературы

- Krause P.J., Fish D., Narasimhan S., Barbour A.G. *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015; 21(7):631–9. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.02.006.

2. Платонов А.Е., Малеев В.В., Карапь Л.С. Боррелиозные возвратные лихорадки: забытые и новые. *Терапевтический архив*. 2010; 11(82):74–80.
3. Wagemakers A., Staarink P.J., Sprong H., Hovius J.W.R. *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends Parasitol.* 2015; 31(6):260–9. DOI: 10.1016/j.pt.2015.03.008.
4. Henningsson A.J., Asgeirsson H., Hammas B., Karisson E., Parke A., Hoornstra D., Wilhelmsson P., Hovius J.W. Two cases of *Borrelia miyamotoi* Meningitis, Sweden, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(10):1965–8. DOI: 10.3201/eid2510.190416.
5. Hoornstra D., Koetsveld J., Sprong H., Platonov A.E., Hovius J.W. *Borrelia miyamotoi* disease in an immunocompetent patient, Western Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(9):1770–2. DOI: 10.3201/eid2409.180806.
6. Ravagnan S., Tomassone L., Montarsi F., Krawczyk A.I., Mastrorilli E., Sprong H., Milani A., Rossi L., Capelli G. First detection of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes ricinus* ticks from northern Italy. *Parasit. Vectors*. 2018; 11(1):130. DOI: 10.1186/s13071-018-2713-z.
7. Kim C.M., Seo J.W., Kim D.M., Yun N.R., Park J.W., Chung J.K., Song H.J. Detection of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes nipponensis* in Korea. *PLoS One*. 2019; 14(7):e0220465. DOI: 10.1371/journal.pone.0220465.
8. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., Fisn D., Krause P.J. Humans infected with the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(10):1816–22. DOI: 10.3201/eid1710.101474.
9. Gugliotta J.L., Goethert H.K., Berardi V.P., Telford S.R. 3rd. Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368(3):240–5. DOI: 10.1056/NEJMoa1209039.
10. Hovius J.W.R., de Wever B., Sohne M., Brouwer M.C., Coumou J., Wagemakers A., Oei A., Knol H., Narasimhan S., Hodiamont C.J., Jahfari S., Pals S.T., Horlings H.M., Fikrig E., Sprong H., van Oers M.H. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet*. 2013; 382(9892):658. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61644-X.
11. Fukunaga M., Koreki Y. The flagellin gene of *Borrelia miyamotoi* sp. nov. and its phylogenetic relationship among *Borrelia* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995; 134(2-3):255–8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07947.x.
12. Kiewra D., Stanczak J., Richter M. *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in Lower Silesia, Poland – preliminary study. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5(6):892–7. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.07.004.
13. Szekeres S., Lügner J., Fingerle V., Margos G., Földvári G. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in questing ticks from a recreational coniferous forest of East Saxony, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017; 8(6):922–7. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.08.002.
14. Remesar S., Díaz P., Venzal J.M., Prieto A., Estrada-Peña A., Manuel López C., Panadero R., Fernández G., Díez-Baños P., Morrondo P. Longitudinal study of infection with *Borrelia* spp. in questing ticks from North-Western Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2019; 19(11):785–92. DOI: 10.1089/vbz.2019.2442.
15. Козлова И.В., Дорошенко Е.К., Лисак О.В., Джиоев Ю.П., Верхозина М.М., Демина Т.В., Рар В.А., Ткачев С.Е., Фоменко Н.В., Сунцова О.В., Черноиванова О.О., Парамонов А.И., Ревизор А.О., Злобин В.И. Видовое и генетическое разнообразие возбудителей клещевых инфекций на территории Восточной Сибири. *Бюллетень ВЧНЦ СО РАМН*. 2012; 2-2(84):75–82.
16. Платонов А.Е., Карапь Л.С., Гаранина С.Б., Шопенская Т.А., Колясникова Н.М., Платонова О.В., Федорова М.В. Природно-очаговые инфекции в XXI веке в России. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2009; 2:30–5.
17. Любенская О.Н., Бондаренко А.Л., Карапь Л.С. Зараженность клещей *Ixodes persulcatus* возбудителями различных заболеваний в эндемичном регионе европейской части России. *Актуальная инфектология*. 2014; 2(3):49–52.
18. Фоменко Н.В., Ливанова Н.Н., Боргояков В.Ю., Козлова И.В., Шулайкина И.В., Пуховская Н.М., Токаревич К.Н., Ливанов С.Г., Дорошенко Е.К., Иванов Л.И. Выявление *Borrelia miyamotoi* в клещах *Ixodes persulcatus* на территории России. *Паразитология*. 2010; 44(3):201–11.
19. Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Першикова Н.Л., Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Иванова Н.В., Больщакова Н.П., Москвитин С.С., Коробицын И.Г., Гашков С.И., Тютеньков О.Ю., Куранова В.Н., Кравченко Л.Б., Сучкова Н.Г., Агулова Л.П., Локтев В.Б. Генетическое разнообразие инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами в г. Томске и его пригородах. *Паразитология*. 2009; 43(5):374–88.
20. Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Нефедова В.В., Воробьева Н.Н., Фризен В.И., Помелова В.Г., Кузнецова Т.И. Клинико-лабораторная диагностика инфекций, передающихся иксодовыми клещами, в Пермском крае. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2013; 4:11–5.
21. Платонов А.Е., Топоркова М.Г., Колясникова Н.М., Стуколова О.А., Долгова А.С., Бродникова А.В., Махнева Н.А., Карапь Л.С., Коетсвельд J., Шипулин Г.А., Малеев В.В. Клинические проявления иксодового клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*, в контексте иммунного ответа на возбудитель. *Терапевтический архив*. 2017; 89(11):35–43.
22. Pukhovskaya N.M., Morozova O.V., Vysochina N.P., Belozerova N.B., Ivanov L.I. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in ixodid ticks in the Far East of Russia. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2019; 8:192–202. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2019.01.005.

References

- Krause P.J., Fish D., Narasimhan S., Barbour A.G. *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015; 21(7):631–9. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.02.006.
- Platonov A.E., Maleev V.V., Karan L.S. [Borreliosis relapsing fevers: neglected and new]. *Terapevticheskii Arkhiv [Therapeutic Archive]*. 2010; 11:74–80.
- Wagemakers A., Staarink P.J., Sprong H., Hovius J.W.R. *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends Parasitol.* 2015; 31(6):260–9. DOI: 10.1016/j.pt.2015.03.008.
- Henningsson A.J., Asgeirsson H., Hammas B., Karisson E., Parke A., Hoornstra D., Wilhelmsson P., Hovius J.W. Two cases of *Borrelia miyamotoi* Meningitis, Sweden, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(10):1965–8. DOI: 10.3201/eid2510.190416.
- Hoornstra D., Koetsveld J., Sprong H., Platonov A.E., Hovius J.W. *Borrelia miyamotoi* disease in an immunocompetent patient, Western Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(9):1770–2. DOI: 10.3201/eid2409.180806.
- Ravagnan S., Tomassone L., Montarsi F., Krawczyk A.I., Mastrorilli E., Sprong H., Milani A., Rossi L., Capelli G. First detection of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes ricinus* ticks from northern Italy. *Parasit. Vectors*. 2018; 11(1):130. DOI: 10.1186/s13071-018-2713-z.
- Kim C.M., Seo J.W., Kim D.M., Yun N.R., Park J.W., Chung J.K., Song H.J. Detection of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes nipponensis* in Korea. *PLoS One*. 2019; 14(7):e0220465. DOI: 10.1371/journal.pone.0220465.
- Hoornstra D., Koetsveld J., Sprong H., Platonov A.E., Hovius J.W. *Borrelia miyamotoi* disease in an immunocompetent patient, Western Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(9):1770–2. DOI: 10.3201/eid2409.180806.
- Ravagnan S., Tomassone L., Montarsi F., Krawczyk A.I., Mastrorilli E., Sprong H., Milani A., Rossi L., Capelli G. First detection of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes ricinus* ticks from northern Italy. *Parasit. Vectors*. 2018; 11(1):130. DOI: 10.1186/s13071-018-2713-z.
- Kim C.M., Seo J.W., Kim D.M., Yun N.R., Park J.W., Chung J.K., Song H.J. Detection of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes nipponensis* in Korea. *PLoS One*. 2019; 14(7):e0220465. DOI: 10.1371/journal.pone.0220465.
- Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., Fisn D., Krause P.J. Humans infected with the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(10):1816–22. DOI: 10.3201/eid1710.101474.
- Gugliotta J.L., Goethert H.K., Berardi V.P., Telford S.R. 3rd. Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368(3):240–5. DOI: 10.1056/NEJMoa1209039.
- Hovius J.W.R., de Wever B., Sohne M., Brouwer M.C., Coumou J., Wagemakers A., Oei A., Knol H., Narasimhan S., Hodiamont C.J., Jahfari S., Pals S.T., Horlings H.M., Fikrig E., Sprong H., van Oers M.H. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet*. 2013; 382(9892):658. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61644-X.
- Fukunaga M., Koreki Y. The flagellin gene of *Borrelia miyamotoi* sp. nov. and its phylogenetic relationship among *Borrelia* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995; 134(2-3):255–8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07947.x.
- Kiewra D., Stanczak J., Richter M. *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in Lower Silesia, Poland – preliminary study. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5(6):892–7. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.07.004.
- Szekeres S., Lügner J., Fingerle V., Margos G., Földvári G. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in questing ticks from a recreational coniferous forest of East Saxony, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017; 8(6):922–7. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.08.002.
- Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., Fisn D., Krause P.J. Humans infected with the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(10):1816–22. DOI: 10.3201/eid1710.101474.
- Gugliotta J.L., Goethert H.K., Berardi V.P., Telford S.R. 3rd. Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368(3):240–5. DOI: 10.1056/NEJMoa1209039.
- Hovius J.W.R., de Wever B., Sohne M., Brouwer M.C., Coumou J., Wagemakers A., Oei A., Knol H., Narasimhan S., Hodiamont C.J., Jahfari S., Pals S.T., Horlings H.M., Fikrig E., Sprong H., van Oers M.H. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet*. 2013; 382(9892):658. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61644-X.
- Fukunaga M., Koreki Y. The flagellin gene of *Borrelia miyamotoi* sp. nov. and its phylogenetic relationship among *Borrelia* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995; 134(2-3):255–8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07947.x.
- Kiewra D., Stanczak J., Richter M. *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in Lower Silesia, Poland – preliminary study. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5(6):892–7. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.07.004.
- Szekeres S., Lügner J., Fingerle V., Margos G., Földvári G. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in questing ticks from a recreational coniferous forest of East Saxony, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017; 8(6):922–7. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.08.002.
- Remesar S., Díaz P., Venzal J.M., Prieto A., Estrada-Peña A., Manuel López C., Panadero R., Fernández G., Díez-Baños P., Morrondo P. Longitudinal study of infection with *Borrelia* spp. in questing ticks from North-Western Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2019; 19(11):785–92. DOI: 10.1089/vbz.2019.2442.
- Козлова И.В., Дорошенко Е.К., Лисак О.В., Джиоев Ю.П., Верхозина М.М., Демина Т.В., Рар В.А., Ткачев С.Е., Фоменко Н.В., Сунцова О.В., Черноиванова О.О., Парамонов А.И., Ревизор А.О., Злобин В.И. Видовое и генетическое разнообразие возбудителей клещевых инфекций на территории Восточной Сибири. *Бюллетень ВЧНЦ СО РАМН*. 2012; 2-2(84):75–82.
- Платонов А.Е., Карапь Л.С., Гаранина С.Б., Шопенская Т.А., Колясникова Н.М., Платонова О.В., Федорова М.В. Природно-очаговые инфекции в XXI веке в России. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2009; 2:30–5.
- Любенская О.Н., Бондаренко А.Л., Карапь Л.С. Зараженность клещей *Ixodes persulcatus* возбудителями различных заболеваний в эндемичном регионе европейской части России. *Актуальная инфектология*. 2014; 2(3):49–52.
- Фоменко Н.В., Ливанова Н.Н., Боргояков В.Ю., Козлова И.В., Шулайкина И.В., Пуховская Н.М., Токаревич К.Н., Ливанов С.Г., Дорошенко Е.К., Иванов Л.И. Выявление *Borrelia miyamotoi* в клещах *Ixodes persulcatus* на территории России. *Паразитология*. 2010; 44(3):201–11.
- Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Першикова Н.Л., Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Иванова Н.В., Больщакова Н.П., Москвитин С.С., Коробицын И.Г., Гашков С.И., Тютеньков О.Ю., Куранова В.Н., Кравченко Л.Б., Сучкова Н.Г., Агулова Л.П., Локтев В.Б. Генетическое разнообразие инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами в г. Томске и его пригородах. *Паразитология*. 2009; 43(5):374–88.
- Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Нефедова В.В., Воробьева Н.Н., Фризен В.И., Помелова В.Г., Кузнецова Т.И. Клинико-лабораторная диагностика инфекций, передающихся иксодовыми клещами, в Пермском крае. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2013; 4:11–5.
- Платонов А.Е., Топоркова М.Г., Колясникова Н.М., Стуколова О.А., Долгова А.С., Бродникова А.В., Махнева Н.А., Карапь Л.С., Коетсвельд J., Шипулин Г.А., Малеев В.В. Клинические проявления иксодового клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*, в контексте иммунного ответа на возбудитель. *Терапевтический архив*. 2017; 89(11):35–43.
- Pukhovskaya N.M., Morozova O.V., Vysochina N.P., Belozerova N.B., Ivanov L.I. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in ixodid ticks in the Far East of Russia. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2019; 8:192–202. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2019.01.005.

16. Platonov A.E., Karan' L.S., Garanina S.B., Shopenskaya T.A., Kolyasnikova N.M., Platonova O.V., Fedorova M.V. [Natural-focal infections in Russia in the 21st century]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2009; 2:30–35.
17. Lyubeznova O.N., Bondarenko A.L., Karan' L.S. [Infectiousness of *Ixodes persulcatus* ticks with pathogens of various diseases in endemic regions of European Russia]. *Actual'naya Infektologiya [Actual Infectiology]*. 2014; 2(3):49–52.
18. Fomenko N.V., Livanova N.N., Borgoyakov V.Yu., Kozlova I.V., Shulaykina I.V., Pukhovskaya N.M., Tokarevich K.N., Livanov S.G., Doroshchenko E.K., Ivanov L.I. [Detection of *Borrelia miyamotoi* in ticks *Ixodes persulcatus* from Russia]. *Parazitologiya [Parasitology]*. 2010; 44(3):201–11.
19. Chausov E.V., Ternovoy V.A., Protopopova E.V., Konovalova S.N., Kononova Yu.V., Pershikova N.L., Moskvitina N.S., Romanenko V.N., Ivanova N.V., Bol'shakova N.P., Moskvitin S.S., Korobitsin I.G., Gashkov S.I., Tyuten'kov O.Yu., Kuranova V.N., Kravchenko L.B., Suchkova N.G., Agulova L.P., Loktev V.B. [Genetic diversity of Ixodidae tick-borne pathogens in Tomsk city and its suburbs]. *Parazitologiya [Parasitology]*. 2009; 43(5):374–88.
20. Teterin V.Yu., Korenberg E.I., Nefedova V.V., Vorob'eva N.N., Frizen V.I., Pomelova V.G., Kuznetsova T.I. [Clinical and laboratory diagnosis of infections transmitted by ixodes ticks in the Perm Territory]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2013; 4:11–5.
21. Platonov A.E., Toporkova M.G., Kolyasnikova N.M., Stukolova O.A., Dolgova A.S., Brodovikova A.V., Makhneva N.A., Karan' L.S., Koetsveld J., Shipulin G.A., Maleev V.V. [Clinical presentation of Ixodes tick-borne borreliosis caused by *Borrelia miyamotoi* in the context of an immune response to the pathogen]. *Terapevtichesky Arkhiv [Therapeutic Archive]*. 2017; 89(11):35–43. DOI: 10.17116/terarkh2017891135-43.
22. Pukhovskaya N.M., Morozova O.V., Vysochina N.P., Belozerova N.B., Ivanov L.I. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in ixodid ticks in the Far East of Russia. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2019; 8:192–202. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2019.01.005.

Authors:

Tupota N.L., Ternovoy V.A., Kartashov M.Yu., Ponomareva E.P., Loktev V.B. State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Об авторах:

Тупота Н.Л., Терновой В.А., Карташов М.Ю., Пономарева Е.П., Локтев В.Б. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

**М.В. Цимбалистова¹, В.М. Сорокин¹, Н.В. Аронова¹, А.С. Анисимова¹, Н.Л. Пичурина¹,
Н.И. Пасюкова¹, Н.А. Селянская¹, С.О. Водопьянов¹, А.С. Водопьянов¹, Р.В. Писанов¹,
Н.В. Павлович¹, Е.В. Ковалев², А.К. Носков¹**

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ШТАММОВ *FRANCISELLA TULARENSIS*,
ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2020 г.**

¹ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российской Федерации;
²Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Ростовской области, Ростов-на-Дону, Российской Федерации

Цель работы – изучение биологических свойств и генетических характеристик штаммов возбудителя туляремии, изолированных в природных очагах Ростовской области в 2020 г. **Материалы и методы.** Полевой материал исследовали серологическим, бактериологическим, биологическим и молекулярно-генетическими методами. Получение белковых спектров исследуемых культур методом MALDI-TOF MS проводили с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics и программного обеспечения Flex Control, идентификацию штаммов – с помощью программы BiotypeR. Генетические характеристики штаммов определяли методами VNTR- и INDEL-типовирования и SNP-анализом. **Результаты и обсуждение.** При мониторинге природных очагов туляремии от мышевидных грызунов с помощью биологической пробы выделены шесть штаммов возбудителя туляремии. Показано, что по своим биологическим свойствам, а также в соответствии с данными ПЦР-анализа и INDEL-типовирования по каноническим маркерам все штаммы являются типичными представителями вида *Francisella tularensis* subsp. *holarctica biovar EryR*. При VNTR-типовировании по шести генетическим локусам установлено, что штаммы относятся к четырем индивидуальным генотипам. Штамм, выделенный в 2020 г. в природном очаге Сальского района, оказался идентичен штамму, выделенному в этом же районе в 1989 г. На основе полногеномного секвенирования двух штаммов обнаружено, что по изучаемому набору SNP-маркеров они наиболее близки культурам, изолированным в Турции (2009, 2012 гг.) и в Ханты-Мансийске (2013 г.). Таким образом, установлено, что в природных очагах Ростовской области в течение длительного времени могут циркулировать как идентичные (или близкородственные) клоны возбудителя туляремии, так и появляться новые штаммы с уникальными генотипами, ранее не описанными для Ростовской области.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, выделение штаммов, биологические свойства, INDEL-типовирование, VNTR-типовирование, SNP-типовирование.

Корреспондирующий автор: Павлович Наталья Владимировна, e-mail: info@tularemia.ru.

Для цитирования: Цимбалистова М.В., Сорокин В.М., Аронова Н.В., Анисимова А.С., Пичурина Н.Л., Пасюкова Н.И., Селянская Н.А., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Павлович Н.В., Ковалев Е.В., Носков А.К. Биологические свойства и генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, изолированных на территории Ростовской области в 2020 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 3:134–140. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-134-140.

Поступила 29.09.2020. Отправлена на доработку 24.02.2021. Принята к публ. 26.02.2021.

**M.V. Tsimbalistova¹, V.M. Sorokin¹, N.V. Aronova¹, A.S. Anisimova¹, N.L. Pichurina¹,
N.I. Pasyukova¹, N.A. Selyanskaya¹, S.O. Vodop'yanov¹, A.S. Vodop'yanov¹, R.V. Pisanov¹,
N.V. Pavlovich¹, E.V. Kovalev², A.K. Noskov¹**

Biological Properties and Genetic Characteristics of *Francisella tularensis* Strains Isolated in the Territory of the Rostov Region in 2020

¹Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

²Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to investigate biological properties and genetic characteristics of tularemia agent strains isolated from natural foci of the Rostov Region in 2020. **Materials and methods.** Field material from natural foci of the Rostov Region was examined by serological, bacteriological, biological, and molecular-genetic methods. Cultural-morphological, biochemical, antigenic and pathogenic properties of isolated cultures were studied. Protein profiles were obtained through MALDI-TOF MS using mass spectrometer Autoflex speed III Bruker Daltonics and Flex Control of BiotypeR software. The genetic characteristics of the strains were determined by VNTR and INDEL typing and SNP analysis. **Results and discussion.** Six strains of tularemia pathogen were isolated from mouse-like rodents using biological method. The investigation of their biological features and data of PCR analysis and INDEL typing with canonical markers showed that all strains are typical representatives of the *Francisella tularensis* subsp. *holarctica biovar EryR*. VNTR typing by six genetic loci revealed that all strains belong to four individual genotypes. The strain isolated in 2020 in the Salsky district was identical to the strain which was isolated in the same area in 1989. Based on the whole genome sequencing of two strains, we established that they are closest to the cultures isolated in Turkey (2009, 2012) and Khanty-Mansiysk (2013) by the studied set of SNP markers. Thus, we found that both identical (or closely related) clones of the tularemia agent and new strains with unique genotypes which previously were not described for the Rostov Region can circulate in natural foci of this region for a long period of time.

Key words: *Francisella tularensis*, isolation of strains, biological properties, INDEL-typing, VNTR-typing, SNP-typing.

Conflict of interest: The authors confirm the absence of conflict of financial / non-financial interest relating to the writing of the manuscript.

Corresponding author: Natalia V. Pavlovich, e-mail: info@tularemia.ru.

Citation: Tsimbalistova M.V., Sorokin V.M., Aronova N.V., Anisimova A.S., Pichurina N.L., Pasukova N.I., Selyanskaya N.A., Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Pisarov R.V., Pavlovich N.V., Kovalev E.V., Noskov A.K. Biological Properties and Genetic Characteristics of *Francisella tularensis* Strains Isolated in the Territory of the Rostov Region in 2020. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021;3:134–140. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-134-140.

Received 29.09.2020. Revised 24.02.2021. Accepted 26.02.2021.

Tsimbalistova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4091-649X>
 Sorokin V.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1835-1496>
 Aronova N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7772-9276>
 Anisimova A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4010-2138>
 Pichurina N.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1876-5397>
 Pasukova N.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1525-5693>
 Selyanskaya N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0008-4705>

Vodop'yanov S.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>
 Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>
 Pisarov R.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>
 Pavlovich N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>
 Kovalev E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0840-4638>
 Noskov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Туляремия – опасное инфекционное заболевание человека и широкого круга млекопитающих. Массовая иммунизация населения в середине XX в. живой туляремийной вакциной позволила снизить заболеваемость до спорадического уровня, и в настоящее время туляремия относится к так называемым вакциноуправляемым инфекциям [1, 2]. Вместе с тем природные очаги болезни характеризуются стабильностью, что проявляется их циклической активацией и, как следствие, формированием эпидемических рисков возникновения случаев заболевания среди восприимчивого населения. Природные очаги туляремии в дельтах рек Волги, Дона, Урала и в Московской области известны более 90 лет. Согласно данным Т.Ю. Кудрявцевой с соавт. (2019), с 2009 по 2018 год в России зарегистрировано 1944 случая заболевания человека туляремией, из которых 1005 имели место во время эпидемической вспышки в Ханты-Мансийском автономном округе (2013 г.). Спорадическая и групповая заболеваемость туляремией в последние годы наблюдалась в основном на территориях Северо-Западного и Сибирского федеральных округов. В 2018 г. в стране зарегистрирован 71 случай туляремии в 19 регионах страны [3]. Стабильность природных очагов связана с биологическими особенностями туляремийного микроба – широким кругом хозяев и переносчиков, с одной стороны, и его высокой устойчивостью к факторам внешней среды – с другой. Это определяет необходимость пристального внимания и системного мониторинга состояния активности эндемичных территорий и оценки рисков заболеваемости людей.

Ростовская область является эндемичной по туляремии, причем природные очаги пойменно-болотного и степного типов зарегистрированы в 35 из 42 муниципальных образований. Поэтому на сегодняшний день болезнь остается актуальной для Ростовской области [4]. Следует подчеркнуть, что с 1996 по 2017 год эпидемическая ситуация по туляремии в области оценивалась как стабильно благополучная [4].

Целью настоящей работы явилось изучение биологических свойств и генетических характеристик штаммов возбудителя туляремии, изолированных из природных очагов Ростовской области в 2020 г.

Материалы и методы

Культуры возбудителя туляремии выращивали на плотной питательной среде Т и агаре FT (производство ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск). В связи с высокой температурой окружающей среды (38–40 °C) в питательную среду Т дополнительно вводили полимиксин (100 ед/мл) и цефотаксим (25 мкг/мл) для предотвращения контаминации посторонней микрофлорой.

В качестве типового штамма использовали вакцинный штамм туляремийного микробы *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ subsp. *holarctica*, полученный из музея живых культур Ростовского-на Дону противоочумного института.

Первый этап исследования включал изучение полевого материала с помощью серологических и молекулярно-генетических методов в соответствии с МУ 3.1.2007-05, МУК 4.2.2939-11.

Реакцию нейтрализации антител (РНАт) проводили с туляремийным антигенным эритроцитарным диагностиком (производство Ставропольского противоочумного института) согласно инструкции производителя.

ПЦР для выявления ДНК возбудителя туляремии проводили с использованием набора реагентов «ОМ-Скрин-Туляремия-РВ» производства ЗАО «СИНТОЛ». ДНК из биологических проб выделяли с помощью набора «Рибо-преп» («Амплисенс»). Реакцию выполняли на амплификаторе ДТ-прайм (производство «ДНК-технология»).

Из серологически (РНАт) и ПЦР-позитивных образцов полевого материала для выделения культур туляремийного микробы использовали биологический метод (МУ 3.1.2007-05).

В качестве экспресс-теста для индикации идентификации возбудителя туляремии использовали «ИХ-тест систему *F. tularensis*» (производство ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск).

Цитруллинуреидазную, фосфатазную и β-лактамазную активность определяли в соответствии с ранее описанными методами [5–7].

Антибиотикочувствительность исследуемых культур изучали диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.2495-09 «Определение чувстви-

тельности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам».

Вирулентность изолированных штаммов определяли на беспородных белых мышах (18–20 г), которых подкожно заражали 1–10–100–1000 м.к./мышь. По количеству выживших и павших животных оценивали LD₅₀ или DCL. Все работы с животными выполняли в соответствии с СП 1.3.3118-13 и Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [8].

Белковые профили штаммов изучали методом MALDI-TOF MS с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics и программного обеспечения Flex Control, идентификацию проводили с помощью программы BiotypeR и ранее созданной базы данных «Белковые профили масс-спектров представителей рода *Francisella* для программы MALDI BiotypeR» (свидетельство о регистрации 2014621080).

С целью получения генетических характеристик выделенных культур проводили INDEL-анализ и VNTR-типирование. Для определения подвида штаммов *F. tularensis* использовали пять авторских INDEL-маркеров. VNTR-типирование выполняли с набором 6 VNTR-локусов из 11, ранее предложенных A.J. Vogler *et al.* [9]: M3, M5, M6, M10, M23 и M24. Для уменьшения размеров конечного продукта и повышения точности измерений типирование проводили с помощью модифицированных нами праймеров для указанных локусов. Амплификацию выполняли на программируемом термоциклире «Терцик». По окончании реакции смеси разделяли электрофоретически в 8 % полиакриламидном геле, окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете. Результаты реакции учитывали по наличию и размеру амплификаторов, определяемых по маркеру молекулярных масс и/или ампликону референтного штамма.

Данные о генотипах штаммов возбудителя туляремии, определенных другими авторами, получены из онлайн-базы данных MLVAbank [10]. Кластерный анализ и построение дендрограмм проводили с

помощью авторского программного обеспечения по методам UPGMA и MST (minimal spanning tree). Для построения дендрограммы использовали программу MEGA 5 [11].

В работу включены данные полногеномного секвенирования 22 штаммов туляремийного микроба из базы данных NCBI. Секвенирование двух штаммов 2020 г. проводили на платформе MiSeq Illumina. Сборку геномов и отбор SNP-маркеров для сравнительного анализа выполняли по методике, описанной ранее [12].

Результаты и обсуждение

Ключевым разделом эпидемиологического надзора за туляремией является мониторинг эпизоотологического состояния природных очагов болезни [13].

В 2020 г. проведено эпизоотологическое обследование территории Ростовской области (РО): Неклиновский, Матвеево-Курганский, Мясниковский, Аксайский, Азовский, Куйбышевский, Ремонтненский, Сальский районы и г. Ростов-на-Дону.

Исследование полевого материала проводили с помощью скрининг-методов – серологического теста (РНАт) и ПЦР-анализа. При получении положительных результатов в обоих тестах для обнаружения в полевом материале живых бактерий проводили биологическую пробу с использованием чувствительных лабораторных животных (белые мыши).

Материал от биопробных животных (гомогенаты печени, селезенки и крови) давал четкие позитивные результаты в РНАт, ИХ-тестах и ПЦР. При посеве на селективную питательную среду нам удалось изолировать шесть культур с подозрением на туляремийный микроб. При их дальнейшем изучении с помощью традиционных микробиологических (культурально-морфологические, биохимические, антигенные свойства, патогенность для лабораторных животных) и современных молекулярно-биологических методов установлено, что все выделенные культуры относятся к виду *F. tularensis*. Таким образом, в результате исследования от мелких грызунов, собранных в Сальском и Ремонтненском районах РО, выделены шесть культур возбудителя туляремии (рис. 1, таблица).

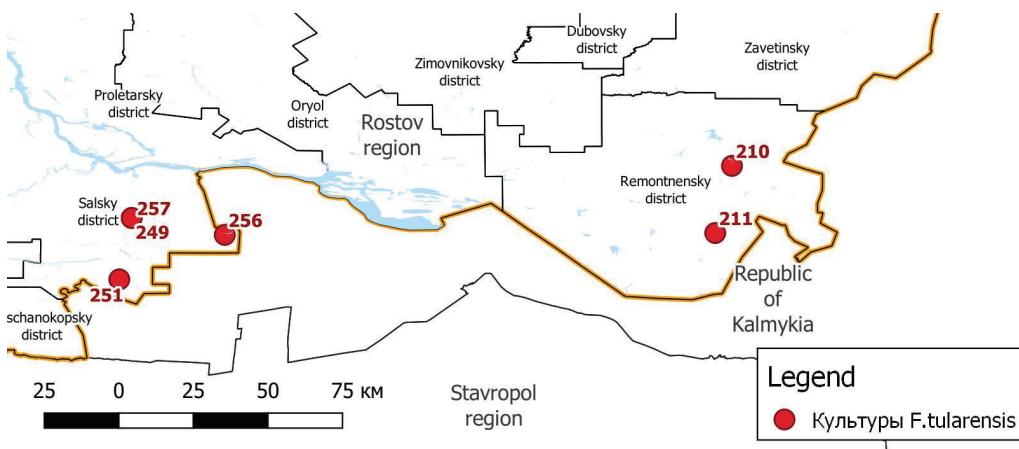


Рис. 1. Регионы Ростовской области и прилегающих к ним территорий с указанием мест изоляции культур возбудителя туляремии в 2020 г.

Fig. 1. Territories of the Rostov Region and neighboring territories where tularemia microbe was isolated in 2020

Sources, areas of *F. tularensis* isolation, VNTR-typing of *F. tularensis* strains

№ штамма <i>F. tularensis</i> Strain No.	Место выделения Areas of isolation	Источник выделения Sources of isolation	VNTR-тиปирование штаммов VNTR-typing of strains					
			M3	M5	M6	M10	M23	M24
210	Ремонтненский район, п. Первомайский, июль 2020 Remontnensky district, Pervomaisky village, July 2020	Общественная полевка <i>Microtus socialis</i> Social vole <i>Microtus socialis</i>	20	2	7	2	1	2
211	Ремонтненский район, п. Первомайский, июль 2020 Remontnensky district, Pervomaisky village, July 2020	Общественная полевка <i>Microtus socialis</i> Social vole <i>Microtus socialis</i>	20	2	7	2	1	2
249	Сальский район, с. Новый Егорлык, июль 2020 Salsky district, Novy Yegorlyk village, July 2020	Обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i> Common vole <i>Microtus arvalis</i>	14	2	4	2	1	2
251	Сальский район, с. Сандата, июль 2020 Salsky district, Sandata village, July 2020	Обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i> Common vole <i>Microtus arvalis</i>	14	2	4	2	1	2
256	Сальский район, с. Романовка, июль 2020 Salsky district, Romanovka village, July 2020	Обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i> Common vole <i>Microtus arvalis</i>	11	2	4	2	1	2
257	Сальский район, с. Новый Егорлык, июль 2020 Salsky district, Novy Yegorlyk village, July 2020	Обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i> Common vole <i>Microtus arvalis</i>	21	2	6	2	1	2

Следующий этап исследования включал подробную характеристику биологических и генетических свойств штаммов, циркулирующих в настоящее время на территории Ростовской области.

С помощью разработанных ранее биохимических экспресс-тестов дополнительно проведена внутривидовая дифференциация культур [5–7]. Обнаружено, что исследуемые штаммы продуцируют β-лактамазу (тест с нитроцефиновыми дисками) и не обладают цитруллинуреидазной и фосфатазной активностями (тест с индоксилфосфатными дисками), что характерно для голарктического подвида туляремийного микроба. Бактерии характеризовались устойчивостью к β-лактамам (пенициллины и цефалоспорины), клиндамицину, полимиксину и эритромицину, но проявляли высокую чувствительность к аминогликозидам, фторхинолонам, рифампицину. Таким образом, все выделенные штаммы относились к виду *F. tularensis* подвиду *holarctica* биовариа *EryR*.

Как известно, ИХ-тест используют как для обнаружения антигена в нативных пробах, так и на этапе идентификации чистой культуры возбудителя. Ранее показано, что тест может быть полезен и при оценке вирулентности туляремийного микроба *in vitro* [14]. Определение патогенных свойств выделенных культур с помощью ИХ-тестов показало, что все они синтезируют полноценную структуру ЛПС, следовательно, являются высоковирулентными для чувствительного хозяина. Эти данные подтверждены в экспериментах *in vivo*: изученные штаммы при инфицировании лабораторных животных (белых мышей) вызывали их гибель при дозе заражения 1–10 м.к.

В результате масс-спектрометрического анализа белковых профилей всех выделенных на территории РО штаммов обнаружено, что они являются типичными представителями голарктического подвида возбудителя [15]. Интересно отметить, что по белковому спектру штаммы 249 и 251, изолированные в Сальском районе в 2020 г., наиболее близки профилю штамма 250, выделенному в том же районе в 1989 г.

Анализ штаммов с применением INDEL-типирования по каноническим маркерам также подтвердил принадлежность штаммов к подвиду *holarctica*.

В настоящее время молекулярно-генетический мониторинг распространения возбудителя туляремии на эндемичных территориях позволяет обнаружить степень родства между штаммами, циркулирующими в окружающей среде, определить генетические линии микроорганизма и провести временной анализ распространения возбудителя. Например, в рамках нескольких международных проектов осуществлено исследование вариабельности геномов штаммов, изолированных в Швеции, Испании, Германии, Японии, Китае, Турции, Чехии, Швейцарии и других странах. SNP-анализ штаммов туляремийного микроба, собранных на трех континентах из 27 стран и от 43 различных хозяев, показал значительную вариабельность геномов голарктических штаммов туляремийного микроба [16, 17]. Тем не менее большинство штаммов, собранных на Европейском континенте представлены двумя ветвями: западноевропейской и восточноевропейской.

Ранее A. Johansson *et al.* (2004) для дифференциации штаммов *F. tularensis* предложили схему VNTR-типирования, основанную на 25 VNTR-локусах [18]. Позднее A.J. Vogler *et al.* (2009) оптимизировали эту схему, выбрав 11 наиболее вариабельных локусов [9]. Для настоящего исследования на основании изучения *in silico* геномов более 200 штаммов *F. tularensis* подвида *holarctica* выбраны 6 наиболее вариабельных для этого подвида VNTR-локусов: M3, M5, M6, M10, M23 и M24. По этим локусам проведено генотипирование изолированных штаммов, результаты которого представлены в таблице.

Кластерный анализ (по локусам M3 и M6) показал, что изученные штаммы представлены четырьмя индивидуальными генотипами и, следовательно, принадлежат к различным генетическим линиям (рис. 2). При этом штаммы 210 и 211 имеют один и тот же генотип. Интересно отметить, что одинаковые генотипы зарегистрированы как у недавно выделенных штаммов 249 и 251, так и у штамма 250, выделенного в 1989 г. В то же время вакциновый штамм 15 НИИЭГ отличался от остальных изученных штаммов. Подобное генетическое разнообразие можно объяснить длительным существованием микроба на данной территории [19].

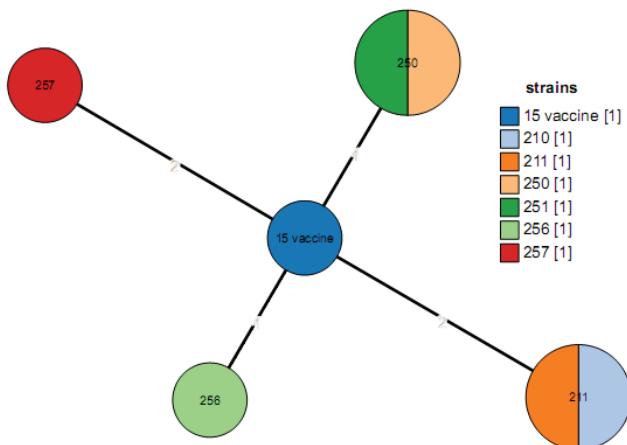


Рис. 2. Кластерный анализ пяти штаммов *F. tularensis*, выделенных на территории Ростовской области в 2020 г. (метод MST-minimal spanning tree)

Fig. 2. Cluster analysis of 5 *F. tularensis* strains isolated in the Rostov Region in 2020 (MST-minimal spanning tree method)

Для проведения сравнительного изучения из онлайн-базы данных MLVAbank получены VNTR-профили 113 штаммов *F. tularensis*, выделенных на территории России в различные годы и исследованных другими авторами по локусам M3, M5, M6, M10, M23 и M24. Это позволило провести кластерный анализ и построить дендрограмму, отражающую генетическую близость изученных штаммов (рис. 3). Близкородственные штаммы 257 (обыкновенная полевка, Сальский район, 2020) и генетически идентичные штаммы 210 и 211 (общественная полевка, Ремонтненский район, 2020) составили отдельную группу и характеризовались генотипами, ранее не обнаруженными на территории Ростовской области. Штамм 256, выделенный в 2020 г. от обыкновенной полевки в Сальском районе, также имел уникальный генотип и вошел в состав самого многочисленного кластера, объединяющего штаммы практически всех эндемичных территорий РФ. И наконец, в другой группе этого кластера находятся штаммы 249, 250 и 251 (Сальский район). Следует особо отметить, что выделенный в 2017 г. от зайца-русака в Целинском районе штамм *F. tularensis* 20198, от которого впоследствии заразились два человека, имел уникальный генотип и генетически располагался достаточно обособленно от ближайших штаммов этого же кластера. Таким образом, проведенное исследование показало, что в Ростовской области при активизации очагов инфекции происходит не только выявление ранее циркулирующих штаммов, но и появление новых генетических линий возбудителя туляремии. Полученные данные позволяют предположить существование на территории Ростовской области независимых микрочагов возбудителя (или одного большого гетерогенного). Это согласуется с данными О.А. Гнусаревой с соавт. (2019), показавшими генетическое разнообразие штаммов, выделенных в Ставропольском крае в 2017 г., которые

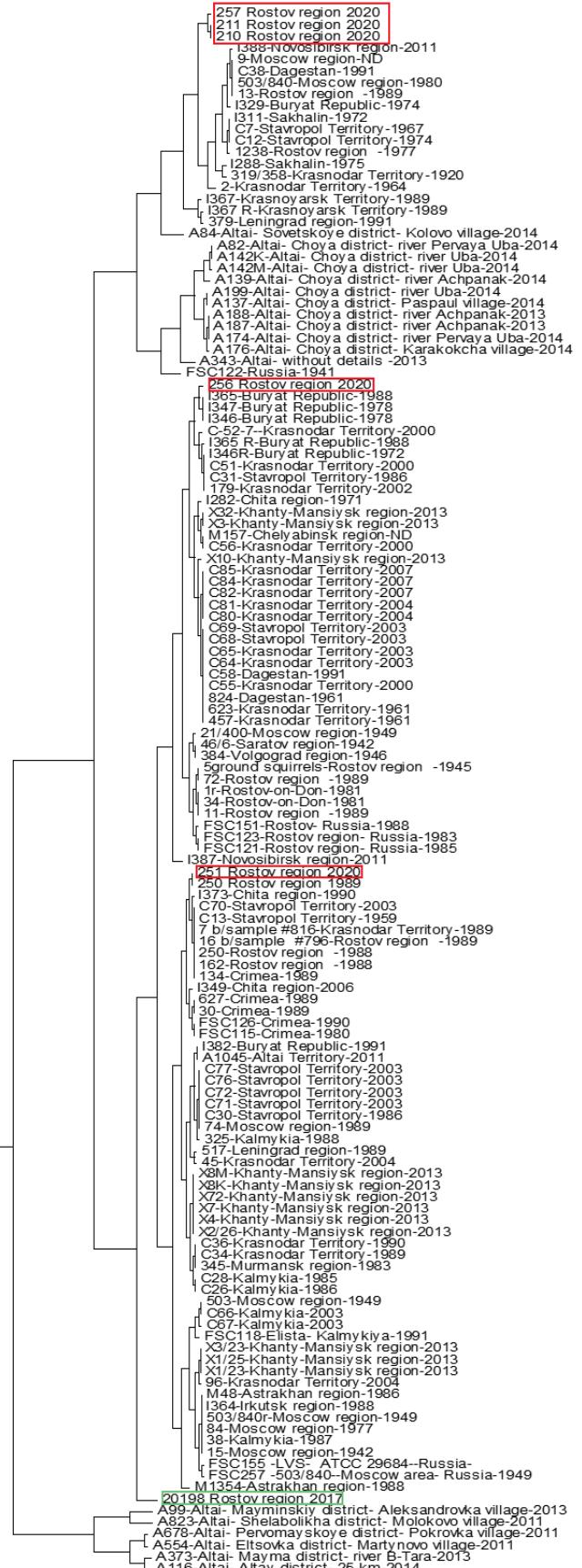


Рис. 3. Дендрограмма VNTR-генотипов *F. tularensis*, построенная по методу UPGMA

Fig. 3. Dendrogram of *F. tularensis* VNTR genotypes, constructed using the UPGMA method

имели, согласно результатам MLVA, разноудаленные генетические дистанции [20]. В связи с этим представляется целесообразным проведение постоянного молекулярно-генетического мониторинга штаммов возбудителя туляремии, циркулирующих на территории Ростовской области, и оценки их эпидемического потенциала.

С целью изучения вариабельности SNP-маркеров проведено полногеномное секвенирование двух штаммов 210 (депонирован в GenBank 22.09.2020 № JACXBQ000000000: JACXBQ010000001 – JACXBQ010000958) и 211. Для сравнительного анализа из базы данных NCBI сформирована коллекция из 22 геномов туляремийного микробы голарктического подвида, выделенных на территории России и Европы. Кластерный анализ на основе сформированного перечня 6324 SNP позволил построить дендрограмму, отражающую генетическое родство изучаемых штаммов (рис. 4).

Удивительно, что ростовские культуры оказались идентичными по изучаемому набору SNP штамму FDC205, выделенному в Турции в 2012 г. В эту же монофилетическую группу попал штамм из Турции 2009 г. (отличия составили три SNP) и изолят, выделенный в Ханты-Мансийске в 2013 г. (отличия по девяти SNP). От вакцинного штамма их отличало 17 SNP, а от штаммов, изолированных в других европейских странах, – более 200 нуклеотидных замен из составленного нами перечня.

Обращает на себя внимание явная территориальная приуроченность отдельных кластеров европейских штаммов. Так, культуры, выделенные в Норвегии в 2011 г., дистанционированы от всех других

штаммов и представлены отдельной группой; штаммы из Испании (2007 и 2008 гг.) также составили отдельную группу. Аналогичная ситуация наблюдается для штаммов из Германии (2008, 2009 и 2015 гг.). Это подтверждает существование стойких микроочагов туляремии.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что циркулирующие в настоящее время на территории Ростовской области штаммы туляремийного микробы являются типичными представителями голарктического подвида *F. tularensis EryR*. При этом они стабильно сохраняют основные видовые биологические свойства: типичную антигенную структуру, высокую патогенность для чувствительных хозяев и чувствительность к аминогликозидам, фторхинолонам и рифампицину. Вместе с тем изолированные из различных очагов культуры *F. tularensis* характеризуются генетическим разнообразием и формируют четыре индивидуальных генотипа. В то же время обнаружено, что на территории Сальского района выделенные в 2020 г. штаммы генетически идентичны штамму, изолированному нами в 1989 г. Это позволяет предполагать, что в природных очагах в течение длительного времени могут стабильно сохраняться идентичные (или близкородственные) клоны штаммов возбудителя туляремии. В то же время в 2020 г. удалось изолировать новые штаммы с уникальными генотипами, ранее не описанными в Ростовской области.

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

Список литературы

- Мещерякова И.С., Добровольский А.А., Демидова Т.Н., Кормилицына М.И., Михайлова Т.В. Трансмиссивная эпидемическая вспышка туляремии в г. Ханты-Мансийске в 2013 году. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; 5(78):14–20.
- Мокриевич А.Н., Кравченко Т.Б., Фирстова В.В., Титарева Г.М., Дятлов И.А., Тимофеев В.С. Туляремия: состояние проблемы и методы исследования. Оболенск; М.: Династия; 2019. 263 с.
- Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Паккина Н.Д., Холин А.В., Мазепа А.В., Куликарова Е.С., Косилько С.А., Бирковская Ю.А., Транквилевский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Эпидемическая активность природных очагов туляремии на территории Российской Федерации в 2018 г. и прогноз ситуации на 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 1:32–41. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-32-41.
- Ковалев Е.В., Карпушенко Г.В., Швагер М.М., Полонский А.В., Сидельников В.В., Гончаров А.Ю., Половинка Н.В. Особенности распространения туляремийной инфекции в Ростовской области. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(6):37–40. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-6-37-40.
- Родионова И.В. Дифференциация географических рас *Francisella tularensis* на основании активности цитруллинуреидазы. *Лабораторное дело*. 1970; 1:42–3.
- Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Фосфатазная активность у представителей рода *Francisella*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1998; 1:10–3.
- Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Особенности формирования устойчивости *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* к β-лактамным антибиотикам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 1:3–8.
- Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза о охране животных, используемых в научных целях. СПб.; 2010. 48 с.
- Vogler A.J., Birdsall D., Wagner D.M., Keim P. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett. Appl. Microbiol.*

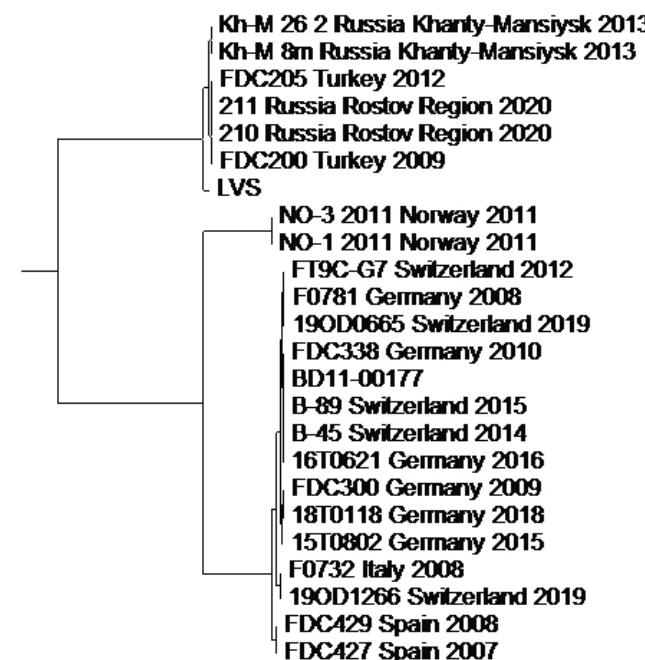


Рис. 4. Дендрограмма, построенная на основе распределения SNP-маркеров по данным полногеномного секвенирования штаммов туляремийного микробы

Fig. 4. Dendrogram based on SNP markers distribution according to a full-genome sequencing of *F. tularensis* strains

- 2009; 48(1):140–4. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02484.x.
10. Grissa I., Bouchon P., Pourcel C., Vergnaud G. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie*. 2008; 90(4):660–8. DOI: 10.1016/j.biochi.2007.07.014.
 11. 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.
 12. Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Мишанин Б.Н., Олейников И.П., Кругликов В.Д., Титова С.В. Молекулярная эпидемиология *Vibrio cholerae* – разработка алгоритма анализа данных полногеномного секвенирования. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2016; 21(3):146–52. DOI: 10.18821/1560-9529-2016-21-3-146-152.
 13. Транквилевский Д.В., Царенко В.А., Жуков В.И. Современное состояние эпизоотологического мониторинга за природными очагами инфекций в Российской Федерации. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2016; 2:19–24.
 14. Павлович Н.В., Чимбалистова М.В., Аронова Н.В., Горбатов А.А. Способ оценки вирулентности *in vitro* штаммов туляремийного микробы подвидов *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, subsp. *mediasiatica*, subsp. *holarctica*. Патент РФ № 2018118456, опубл. 25.07.2019. Бюл. № 21.
 15. Чимбалистова М.В., Павлович Н.В., Аронова Н.В., Чайка И.А., Чайка С.О., Водопьянов А.С. Масс-спектрометрический анализ природных и антиген-измененных штаммов туляремийного микробы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 4:92–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-92-96.
 16. Gyuranecz M., Birdsell D.N., Splettstoesser W., Seibold E., Beckstrom-Sternberg S.M., Makrai L., Fodor L., Fabbri M., Vicari N., Johansson A., Busch J.D., Vogler A.J., Keim P., Wagner D.M. Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(2):290–3. DOI: 10.3201/eid1802.111305.
 17. Siisanen S., Rossow H., Karlsson E., Hemmilä H., Henttonen H., Isomursu M., Kinnunen P.M., Pelkola K., Pelkonen S., Tarkka E., Myrtténäs K., Nikkari S., Forsman M. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in Finland, 1993–2011. *Infect. Dis. (Lond)*. 2015; 47:701–6. DOI: 10.3109/23744235.2015.1049657.
 18. Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Byström M., Fox J., Chu M.C., Forsman M., Sjöstedt A., Keim P. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2004; 186:5808–18. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004.
 19. Schulze C., Heuner K., Myrtténäs K., Karlsson E., Jacob D., Kutzer P., Große K., Forsman M., Grunow R. High and novel genetic diversity of *Francisella tularensis* in Germany and indication of environmental persistence. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(14):3025–36. DOI: 10.1017/S0950268816001175.
 20. Гнусарева О.А., Котенев Е.С., Волынкина А.С., Чишенюк Т.И., Куличенко А.Н. Молекулярно-эпидемиологический анализ вспышки туляремии в Ставропольском крае в 2017 г. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018; 7(3):57–61. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-13008.
- ## References
1. Mesheryakova I.S., Dobrovolsky A.A., Demidova T.N., Kormilitsyna M.I., Mikhailova T.V. Vector-borne epidemic outbreak of tularemia in the town of Khanty-Mansiysk in 2013. *Epidemiologiya i Vaktsinoprophylaktika. [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2014; 5(78):14–20.
 2. Mokrievich A.N., Kravchenko T.B., Firstova V.V., Titareva G.M., Dyatlov I.A., Timofeev V.S. Tularemia: State of the Problem and Research Methods. Obolensk; M.: “Dynasty”; 2019. 263 p.
 3. Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Pakskina N.D., Kholin A.V., Mazepa A.V., Kulikalova E.S., Kosliko S.A., Birkovskaya Yu. A., Trankvilevsky D.V., Khramov M.V., Dyatlov I.A. Epidemic activity of natural tularemia foci in the territory of the Russian Federation in 2018 and forecast of the situation for 2019. *Problemy Osobno Opasnykh Infektsii. [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 1:32–41. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-32-41.
 4. Kovalev E.V., Karpushchenko G.V., Schwager M.M., Polonsky A.V., Sidelnikov V.V., Goncharov A.Yu., Polovinka N.V. Features of distribution of tularemia infection in the Rostov Region. *Epidemiologiya i Vaktsinoprophylaktika. [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2017; 16(6):37–40. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-6-37-40.
 5. Rodionova I.V. Differentiation of the geographical races of *Francisella tularensis* based on the activity of citrulline ureidase. *Laboratornoe delo [Laboratory Practice]*. 1970; 1: 42–3.
 6. Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. The phosphatase activity in representatives of the genus *Francisella*. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii. [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1998; 1:10–3.
 7. Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Features of resistance formation to β-lactam antibiotics in *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii. [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2014; 1:3–8.
 8. Directive of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes 2010/63 / EU. St. Petersburg; 2010.48 p.
 9. Vogler A.J., Birdsall D., Wagner D.M., Keim P. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009; 48(1):140–4. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02484.x.
 10. Grissa I., Bouchon P., Pourcel C., Vergnaud G. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie*. 2008; 90(4):660–8. DOI: 10.1016/j.biochi.2007.07.014.
 11. 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.
 12. Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Vodop'yanov S.O., Mishanin B.N., Oleynikov I.P., Kruglikov V.D., Titova S.V. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* – development of the algorithm for data analysis of whole genome sequencing. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2016; 21(3):146–52. DOI: 10.18821/1560-9529-2016-21-3-146-152.
 13. Trankvilevsky D.V., Tsarenko V.A., Zhukov V.I. The current state of epizootic monitoring of natural foci of infections in the Russian Federation. *Meditinskaya Parazitologiya I Parazitarnye Bolezni. [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2016; 2: 19–24.
 14. Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V., Aronova N.V., Gorbatov A.A. Method for *in vitro* virulence assessment of tularemia microbe strains of subspecies *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, subsp. *mediasiatica*, subsp. *holarctica*. RF patent No. 2018118456, publ. 07/25/2019. Bul. No. 21.
 15. Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V., Aronova N.V., Chaika I.A., Chaika S.O., Vodop'yanov A.S. Mass spectrometric analysis of natural and antigen-modified strains of tularemia agent. *Problemy Osobno Opasnykh Infektsii. [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:92–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-92-96.
 16. Gyuranecz M., Birdsell D.N., Splettstoesser W., Seibold E., Beckstrom-Sternberg S.M., Makrai L., Fodor L., Fabbri M., Vicari N., Johansson A., Busch J.D., Vogler A.J., Keim P., Wagner D.M. Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(2):290–3. DOI: 10.3201/eid1802.111305.
 17. Siisanen S., Rossow H., Karlsson E., Hemmilä H., Henttonen H., Isomursu M., Kinnunen P.M., Pelkola K., Pelkonen S., Tarkka E., Myrtténäs K., Nikkari S., Forsman M. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in Finland, 1993–2011. *Infect. Dis. (Lond)*. 2015; 47:701–6. DOI: 10.3109/23744235.2015.1049657.
 18. Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Byström M., Fox J., Chu M.C., Forsman M., Sjöstedt A., Keim P. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2004; 186:5808–18. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004.
 19. Schulze C., Heuner K., Myrtténäs K., Karlsson E., Jacob D., Kutzer P., Große K., Forsman M., Grunow R. High and novel genetic diversity of *Francisella tularensis* in Germany and indication of environmental persistence. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(14):3025–36. DOI: 10.1017/S0950268816001175.
 20. Gnusareva O.A., Kotenov E.S., Volynkina A.S., Chishen'yuk T.I., Kulichenko A.N. Molecular-epidemiological analysis of the tularemia outbreak in the Stavropol Territory in 2017. *Infektsionnye Bolezni. Novosti, Mneniya, Obuchenie. [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2018; 7(3):57–61. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-13008.
- ## Authors:
- Tsimbalistova M.V., Sorokin V.M., Aronova N.V., Anisimova A.S., Pichurina N.L., Pasukova N.I., Selyanskaia N.A., Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Pavlovich N.V., Noskov A.K. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gorkogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: info@tularemia.ru.
- Kovalev E.V. Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region. 7A, 18th Liniya St., Rostov-on-Don, Russian Federation, 344019.
- ## Об авторах:
- Чимбалистова М.В., Сорокин В.М., Аронова Н.В., Анисимова А.С., Пичурина Н.Л., Пасукова Н.И., Селянская Н.А., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Павлович Н.В., Носков А.К. Ростов-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.
- Ковалев Е.В. Управление Роспотребнадзора по Ростовской области. Российская Федерация, 344019, Ростов-на-Дону, ул. 18-я Линия, 7А.

DOI 10.21055/0370-1069-2021-3-141-146

УДК 616.98:579.88(470)

С.Н. Шпынов^{1,2}, Н.В. Рудаков^{1,2}, С.Ю. Зеликман^{1,2}

АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЛИХОРАДКОЙ КУ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ПЕРИОД С 1957 ПО 2019 ГОД

¹ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций», Омск, Российская Федерация;²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», Омск, Российская Федерация

Цель – проанализировать многолетнюю заболеваемость лихорадкой Ку в Российской Федерации, рекомендовать направления совершенствования эпизоотолого-эпидемиологического надзора за этой инфекцией с учетом современного состояния лабораторной диагностики и мониторинга очагов. **Материалы и методы.** Ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости лихорадкой Ку по данным формы № 2 государственной статистической отчетности «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» проведен в РФ с 1957 по 2019 год, в разрезе федеральных округов (ФО) и административных территорий – с 1997 по 2019 год и по результатам исследований референс-центра по риккетсиозам «Омского НИИ природно-очаговых инфекций». **Результаты и обсуждение.** С 1957 по 2019 год в РФ официально зарегистрировано 13836 случаев лихорадки Ку. Максимального значения показатель заболеваемости на 100 тыс. населения достиг в 1957 г. (1,0 %), минимального – в 2008 г. (0,01 %). С 1997 по 2019 год из 2672 зарегистрированных на территории 24 субъектов РФ случаев лихорадки Ку 2224 (83,20 %) пришлось на Южный ФО с 2106 (78,8 %) случаями в Астраханской области. В Ставропольском крае Северо-Кавказского ФО выявлено 173 (6,47 %) случая заболевания. В Центральном ФО зарегистрировано 112 (4,19 %) случаев с максимальным количеством в Воронежской области (82). В Приволжском ФО выявлен 81 (3,03 %) случай, из них 54 – в Ульяновской области. На территории Северо-Западного ФО зарегистрировано 42 (1,61 %) случая заболевания, 33 – в Ленинградской области и Санкт-Петербурге. В Сибирском ФО диагностировано 39 (1,46 %) случаев лихорадки Ку, в Новосибирской области – 24. В Уральском ФО выявлен 1 (0,04 %) случай инфекции. В Дальневосточном ФО отсутствует регистрация заболеваемости лихорадкой Ку. Росздравнадзором зарегистрированы медицинские изделия для диагностики лихорадки Ку. Санация очагов среди сельскохозяйственных животных должна осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими и ветеринарно-санитарными правилами.

Ключевые слова: лихорадка Ку, зооноз, *Coxiella burnetii*, заболеваемость, диагностика, Российская Федерация.

Корреспондирующий автор: Шпынов Станислав Николаевич, e-mail: mail@oniipi.org.

Для цитирования: Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Зеликман С.Ю. Анализ заболеваемости лихорадкой Ку в Российской Федерации в период с 1957 по 2019 год. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 3:141–146. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-141-146.

Поступила 19.02.2021. Отправлена на доработку 24.02.2021. Принята к публ. 02.03.2021.

S.N. Shpynov^{1,2}, N.V. Rudakov^{1,2}, S. Yu. Zelikman^{1,2}

Analysis of Q Fever Incidence in the Russian Federation Between 1957 and 2019

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

²Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to analyze the long-term incidence of Q fever in the Russian Federation, to recommend approaches to improve epizootiological and epidemiological surveillance of this infection, taking into account the current state of laboratory diagnostics and monitoring of foci. **Materials and methods.** A retrospective epidemiological analysis of the Q fever incidence using the data contained in Form No 2 of the state statistical report «Information on infectious and parasitic diseases» was conducted in the Russian Federation for the period of 1957– 2019, by the Federal Districts (FD) and administrative territories, and based on the results of the research of the Reference Center for Rickettsioses of the Omsk Research Institute of Natural Focal Infections. **Results and discussion.** Between 1957 and 2019, 13 836 cases of Q fever were officially registered in the Russian Federation. The maximum value of the morbidity rate per 100 thousand of the population was registered in 1957 (1.0 0/0000), the minimum one – in 2008 (0.01 0/0000). From 1997 to 2019, out of 2672 registered in 24 entities of the Russian Federation cases of Q fever, 2224 (83.20 %) occurred in the Southern FD with 2106 (78.8 %) cases in the Astrakhan Region. In the Stavropol Territory of the North Caucasus FD, 173 (6.47 %) cases of the disease were detected. 112 (4.19 %) cases were registered in the Central FD, with the maximum number in the Voronezh Region (82). In the Volga FD, 81 (3.03 %) cases were identified, 54 of which in the Ulyanovsk Region. 42 (1.61 %) cases of the disease were registered in the North-Western FD, 33 – in the Leningrad Region and St. Petersburg. In the Siberian FD, 39 (1.46 %) cases of Q fever were reported, 24 were diagnosed in the Novosibirsk Region. In the Ural FD, 1 (0.04 %) case of infection was detected. In the Far Eastern FD, there is no registration of Q fever. Presented are medical products for Q fever diagnostics authorized in Russia. Sanitation of the foci among farm animals should be carried out in accordance with the current sanitary-epidemiological and veterinary-sanitary rules.

Key words: Q fever, zoonosis, *Coxiella burnetii*, morbidity, diagnosis, Russian Federation.

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

Corresponding author: Stanislav N. Shpunov, e-mail: mail@oniipi.org.

Citation: Shpunov S.N., Rudakov N.V., Zelikman S.Yu. Analysis of Q Fever Incidence in the Russian Federation Between 1957 and 2019. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:141–146. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-141-146.

Received 19.02.2021. Revised 24.02.2021. Accepted 02.03.2021.

Shpunov S.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4550-3459>
Rudakov N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9566-9214>
Zelikman S.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8284-1684>

Лихорадка Ку – вызываемый *Coxiella burnetii* зооноз с длительным и самостоятельным существованием очагов сельскохозяйственных животных (как при бруцеллезе), а также наличием на отдельных территориях смешанных природно-хозяйственных (антропургических) очагов, характеризующийся разнообразными путями передачи возбудителя, развитием распространенного ретикулоэндотелиоза, клинически сопровождающейся лихорадкой, интоксикацией, полиморфной симптоматикой [1, 2]. При заражении человека обычно развивается острая форма лихорадки Ку, которая клинически проявляется преимущественно в виде атипичной пневмонии и гепатита [3]. При хронизации инфекционного процесса, как правило, развивается эндокардит [3, 4]. Первичные природные очаги на большинстве территорий Российской Федерации к настоящему времени отсутствуют [1, 2]. Лихорадка Ку характеризуется множественностью источников: прежде всего пуховые козы, овцы (очаги мелкого рогатого скота, эпидемически наиболее значимые, обуславливают аэрогенные вспышки), крупный рогатый скот (очаги крупного рогатого скота имеют значение преимущественно в спорадической заболеваемости, молочном пути заражения) – и факторов передачи инфекции (молоко, мясо, шкуры, вода, солома, пыль и др.). С наибольшей частотой заражение людей происходит прямо или опосредованно от сельскохозяйственных животных. Ведущее значение имеют аспирационный (преобладает в очагах мелкого рогатого скота) и контактный пути передачи, меньшее – алиментарный (преимущественно в очагах крупного рогатого скота) [1, 2]. От инфицированных овец и коз во время окотов и позднихabortов происходит массовое поступление *C. burnetii* в окружающую среду, что приводит к заражению обслуживающего персонала ферм и хозяев животных [3, 5, 6]. Подтверждена эпидемиологическая связь между увеличением числа случаев лихорадки Ку у человека с высоким уровнем abortов у коз [7–11]. Необходимо учитывать, что с переходом к частному фермерскому хозяйствованию и передачей надзорных функций на региональный уровень происходит ослабление контроля со стороны ветеринарной службы [12].

Целью исследования являлись анализ многолетней динамики заболеваемости лихорадкой Ку населения Российской Федерации и разработка направлений совершенствования эпизоотолого-эпидемиологического надзора за этой инфекцией с учетом современного состояния лабораторной диагностики и мониторинга очагов.

Материалы и методы

Ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости лихорадкой Ку в РФ проведен за период официальной регистрации с 1957 по 2019 год по данным формы № 2 государственной статистической отчетности «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях», результатам исследований референс-центра по риккетсиозам «Омского НИИ природно-очаговых инфекций». Проанализирована заболеваемость лихорадкой Ку в разрезе федеральных округов и административных территорий в период с 1997 по 2019 год.

Результаты и обсуждение

В период с 1957 по 2019 год в Российской Федерации официально зарегистрировано 13836 случаев лихорадки Ку. Ежегодное количество зарегистрированных случаев лихорадки Ку за изучаемый период сильно варьировало от 1241 в 1957 г. (максимум) до 17 случаев в 2008 г. (минимум), т.е. их максимальное и минимальное количество в год отличались в 73 раза. Максимальное значение показателя заболеваемости на 100 тыс. населения составило 1,0 в 1957 г., минимальное – 0,01 в 2008 г. Из 62 лет наблюдения 36 лет показатель заболеваемости лихорадкой Ку в РФ на 100 тыс. населения составлял 0,1 при среднемноголетнем значении абсолютного показателя заболеваемости, равном 154,5 случая в год.

При изучении динамики заболеваемости можно выделить три периода в официальной регистрации этой зоонозной инфекции. В период с 1957 по 1968 год произошло резкое снижение зарегистрированных случаев лихорадки Ку. За это время значение абсолютного показателя заболеваемости уменьшилось почти в 12 раз – с 1241 до 106 случаев в год (рис. 1), а среднемноголетний показатель заболеваемости составил 469,25 случая в год.

Следующий период – с 1969 по 1999 год – характеризуется стабилизацией регистрации заболеваемости лихорадкой Ку со среднемноголетним показателем заболеваемости 186,32 случая в год при общей тенденции к снижению и колебаниями в отдельные годы.

За последние двадцать лет (2000–2019 гг.) наблюдалось наибольшее снижение выявляемых случаев лихорадки Ку в 1999 (27–0,02 %₀₀₀), 2008 (17–0,01 %₀₀₀) и 2014 (34–0,02 %₀₀₀) гг. В 2019 г. наметилась тенденция к росту заболеваемости, выявлено 286 случаев (0,19 %₀₀₀₀). Это максимальное количество, зарегистрированное с 1974 г., когда было выявлено

330 случаев лихорадки Ку. Среднемноголетний показатель заболеваемости в этот период составил 121,45 случая в год.

Проведен анализ 2672 случаев заболевания лихорадкой Ку, зарегистрированных в период с 1997 по 2019 год на территории 24 субъектов РФ в разрезе федеральных округов и административных территорий.

Наибольшее количество случаев лихорадки Ку – 2224 – зарегистрировано в Южном федеральном округе (ЮФО) на четырех административных территориях: в Астраханской (2106), Волгоградской (99) и Ростовской (3) областях, Республике Калмыкия (16), что составило 83,20 % от общероссийского показателя. За указанный период в Астраханской области зарегистрировано 2106 случаев лихорадки Ку, что составило 78,8 % от всех случаев в Российской Федерации, максимальное количество (228; 22,45 %) – в 2019 г. Наблюдается выраженная связь показателя в РФ с количеством зарегистрированных случаев в Астраханской области, что указывает на ведущее место данного субъекта в формировании заболеваемости этой нозологической формой на федеральном уровне (рис. 2).

В Северо-Кавказском федеральном округе (СКФО) на территории Ставропольского края выявлено 173 случая лихорадки Ку, что соответствует 6,47 % от суммарного количества по России. Максимальное количество случаев заболевания в крае зарегистрировано также в 2019 г. (45; 1,61 %).

В Центральном федеральном округе (ЦФО) зарегистрировано 112 случаев лихорадки Ку (4,19 %) на шести территориях: в Воронежской (82), Тверской (14), Белгородской (2), Ивановской (1), Смоленской (1) областях и г. Москве (12). За анализируемый период максимальное количество случаев лихорадки Ку в ЦФО выявлено в Воронежской области в 2003 г. (18; 0,75 %).

В Приволжском федеральном округе (ПФО) в пяти субъектах РФ выявлен 81 (3,03 %) случай

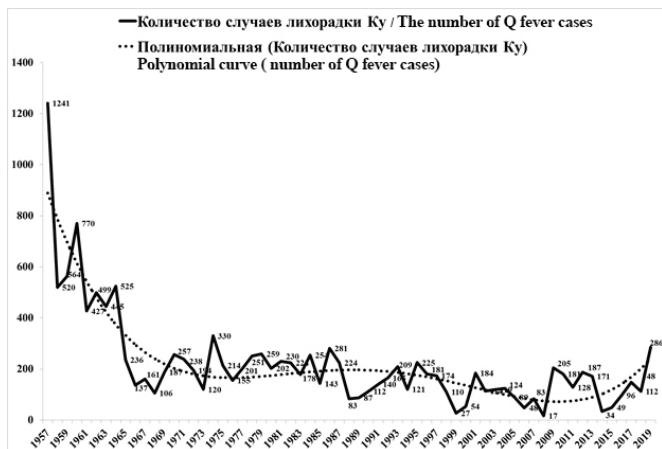


Рис. 1. Динамика официальной регистрации случаев лихорадки Ку в Российской Федерации в период с 1957 по 2019 год

Fig. 1. Dynamics of official registration of Q fever cases in the Russian Federation between 1957 and 2019

этой инфекции: в Республике Мордовия (13), Ульяновской (54), Самарской (6) и Оренбургской (3) областях, в Пермском крае (5). Наибольшее количество заболеваний зарегистрировано в Ульяновской области в 2004 г. (12; 0,87 %).

На трех административных территориях Северо-Западного федерального округа (СЗФО) зарегистрировано 42 (1,61 %) случаев лихорадки Ку: в Вологодской (9), Ленинградской (12) областях и г. Санкт-Петербурге (21). Наибольшее количество случаев лихорадки Ку зарегистрировано в Санкт-Петербурге (5; 0,11 %) в 2005 г., в Вологодской области в том же году при трех зарегистрированных случаях лихорадки Ку показатель заболеваемости составил 0,24 %.

В Сибирском федеральном округе (СФО) 39 (1,46 %) случаев лихорадки Ку зарегистрированы на территории четырех субъектов РФ: в Новосибирской (24) и Кемеровской (2) областях, Алтайском крае (9), Республике Тыва (4). Наибольшее количество заболеваний зарегистрировано в Новосибирской области в 1999 г. (6; 0,22 %).

На территории Уральского федерального округа (УФО) за весь указанный период зарегистрирован один (0,04 %) случай этой инфекции в Ханты-Мансийском автономном округе.

За указанный период официально не зарегистрирован ни одного случая инфекции в Дальневосточном федеральном округе (ДФО).

Таким образом, регистрация заболеваемости лихорадкой Ку по федеральным округам и субъектам РФ отличается выраженной неравномерностью (рис. 3). Наибольшее количество случаев лихорадки Ку регистрировали в Ставропольском крае, Астраханской, Волгоградской, Воронежской и Ульяновской областях.

При анализе показателя заболеваемости лихорадкой Ку на 100 тыс. населения за период с 2009 по 2019 год отмечено абсолютное превышение его значений на территории ЮФО. Только в 2016 и 2018 гг. показатель заболеваемости на 100 тыс. насе-

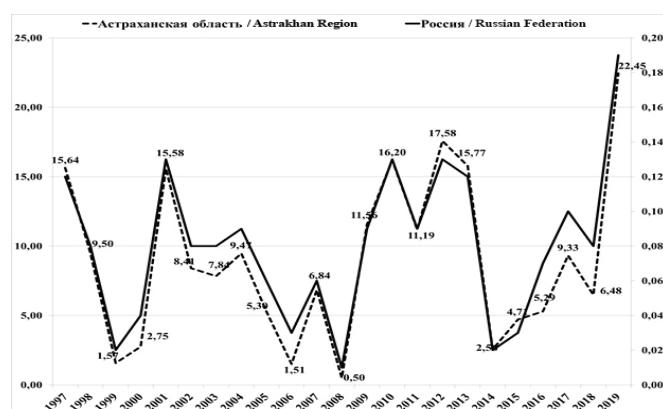


Рис. 2. Динамика заболеваемости лихорадкой Ку на 100 тыс. населения в Российской Федерации и Астраханской области период с 1997 по 2019 год

Fig. 2. Dynamics of the Q fever incidence per 100 thousand of the population in the Russian Federation and the Astrakhan Region during the period of 1997–2019

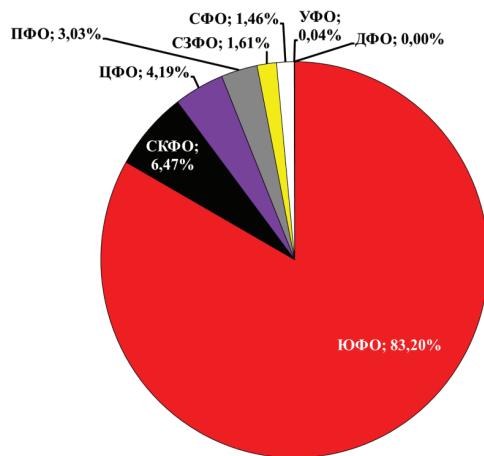


Рис. 3. Доля федеральных округов Российской Федерации в заболеваемости лихорадкой Ку в период с 1997 по 2019 год

Fig. 3. The share of the Federal Districts of the Russian Federation in the incidence of Q fever in the period from 1997 to 2019

ления в СКФО имел незначительное превышение (рис. 4).

Проведен анализ сезонной динамики заболеваемости лихорадкой Ку по месяцам в Российской Федерации в 1999–2018, 2014–2018 гг., в Астраханской области в 2014–2018 гг. (рис. 5). Отмечается выраженная весенне-летняя сезонность заболеваемости с максимальным количеством регистрируемых случаев заболевания в период с мая по август. При этом в Российской Федерации в период с 1999 по 2018 год произошли снижение доли летних месяцев и увеличение доли осенне-зимнего периода в структуре заболеваемости.

В настоящее время отсутствуют данные официальной регистрации лихорадки Ку среди сельскохозяйственных животных в Российской Федерации. Выборочные серологические исследования сывороток крови сельскохозяйственных животных в различные периоды осуществлялись лишь на отдельных территориях РФ [1, 2, 13]. Так, результаты проведенного серологического мониторинга выявили значительное распространение коксиеллеза крупного рогатого скота в хозяйствах Омской области. Из 29 обследованных хозяйств лихорадка Ку выявлена в 17 (59 %), при этом серопозитивность скота составляла в среднем 10,6 %, что существенно не отличается от результатов исследований в период 1997–2006 гг. и ранее (1979–1985 гг.) [1]. Учитывая, что лихорадка Ку в Омской области у людей и сельскохозяйственных животных выявлена еще в 50-е гг. прошлого века, можно отметить длительную (более 60 лет) энзоотичность региона по данной инфекции [2]. Подтверждением риска инфицирования *C. burnetii* в Омской области являются результаты серологического обследования в 2016–2020 гг. в ИФА 9843 человек из групп профессионального риска. В целом антитела выявлены у $(3,3 \pm 0,2)$ % обследованных, в том числе среди ветеринарных работников станций по борьбе

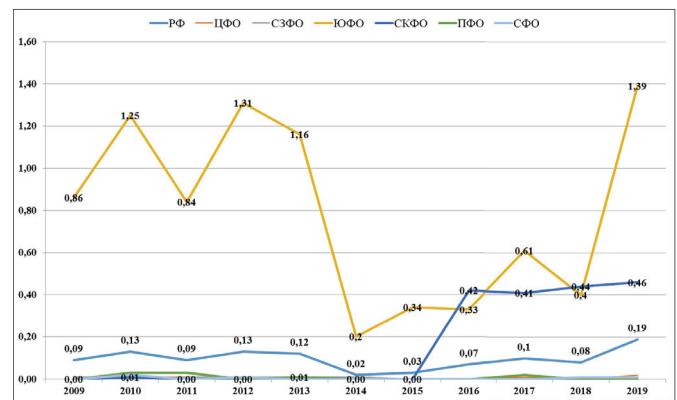


Рис. 4. Динамика показателей заболеваемости лихорадкой Ку на 100 тыс. населения в Российской Федерации и в федеральных округах в период с 2009 по 2019 год

Fig. 4. The dynamics of the Q fever incidence per 100 thousand of the population in the Russian Federation and in the Federal Districts in the period from 2009 to 2019

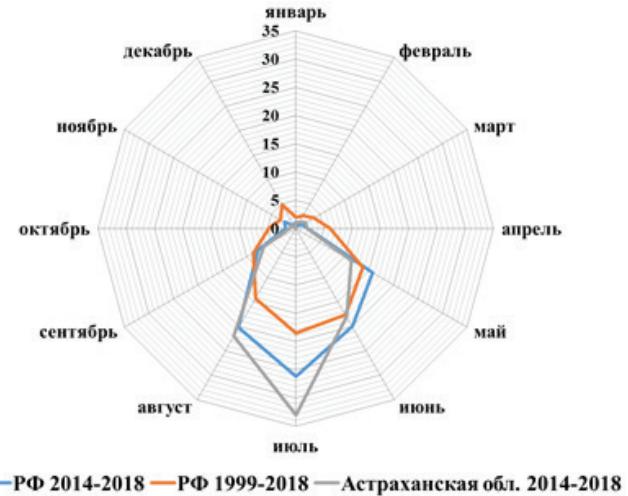


Рис. 5. Сезонное распределение заболеваемости лихорадкой Ку (по месяцам, %) в Российской Федерации в 1999–2018, 2014–2018 гг. и в Астраханской области в 2014–2018 гг.

Fig. 5. Seasonal distribution of the incidence of Q fever (by month, in %) in the Russian Federation from 1999 to 2018, from 2014 to 2018, and in the Astrakhan Region from 2014 to 2018

с болезнями животных 13 районов области и Омска – у $(10,9 \pm 1,6)$ %, работников мясопромышленных предприятий Омской области – у $(2,5 \pm 0,1)$ % [14].

Традиционно пять регионов России являются лидерами в разведении мелкого рогатого скота (МРС) – овцеводстве и козоводстве. Республика Дагестан занимает в России первое место по численности поголовья МРС, его доля в общероссийском стаде составляет 21,1 %. На втором месте – Республика Калмыкия с долей 9,7 %, Ставропольский край занимает третье место с долей 9,1 %, на четвертом месте – Астраханская область с 6,0 % от всего поголовья МРС России, Карачаево-Черкесская Республика – пятое место (4,9 %).

Необходимо отметить, что по численности поголовья МРС Республика Дагестан в 3,5 раза

превышает поголовье овец и коз в Астраханской области. При этом в период с 1997 по 2019 год там не зарегистрировано ни одного случая лихорадки Ку, однако в тот же период на территории Астраханской области выявлено 2106 случаев этой инфекции.

Учитывая это, можно предположить, что на территории ряда регионов ЮФО и СКФО регистрируемая заболеваемость лихорадкой Ку при улучшении лабораторной диагностики может существенно измениться.

Эпизоотолого-эпидемиологический надзор за лихорадкой Ку и другими инфекциями, общими для человека и животных, должен проводиться совместными усилиями медицинских и ветеринарных служб в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими и ветеринарно-санитарными правилами. Необходимы ежегодные профилактические медицинские осмотры с серологическим обследованием лиц, подвергающихся профессиональному риску заражения. В соответствии с СП 3.1.7.2811-10 «Профилактика коксиеллеза (лихорадка Ку)» должны выполняться серологические исследования с целью выявления антител к коксиеллам Бернета в ИФА групп профессионального риска, длительно лихорадочных больных, больных с внебольничными пневмониями, больных с подозрением на лихорадку Ку на неблагополучных территориях.

В настоящее время в РФ для диагностики лихорадки Ку выпускаются «Набор для выявления антител класса G к антигенам *Coxiella burnetii* (Тест-система ИФА)» и «Набор для выявления антигенов коксиелл Бернета (Тест-система ИФА)» производства НИИЭМ им. Пастера (г. Санкт-Петербург). Для детекции ДНК в образцах внешней среды и биологическом материале от человека применяется «Набор реагентов для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL» производства ЦНИИЭ (г. Москва).

В Российской Федерации разработаны живая (М-44), полученная на основе аттенуированного варианта штамма М-44 *C. burnetii* (III группа патогенности), и химическая вакцины против лихорадки Ку.

Основные мероприятия по санации очагов лихорадки Ку среди сельскохозяйственных животных проводятся в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими и ветеринарно-санитарными правилами.

Представляет интерес прогнозирование эпидемиологической ситуации при этой зоонозной инфекции в Российской Федерации, учитывая длительный период стабилизации регистрации заболеваемости лихорадкой Ку, характеризующийся тенденцией к снижению с колебаниями в отдельные годы. При этом нельзя забывать о крупнейшей из известных вспышек лихорадки Ку, произошедшей в Нидерландах в 2007–2010 гг., когда было зарегистрировано 4026 случаев острой формы заболевания среди людей, а общее

количество инфицированных могло достигнуть 40 тыс. человек [7, 15]. Источником вспышки послужили козы. Показано, что передача *C. burnetii* могла осуществляться в виде аэрозоля, при этом риск заражения населения, проживающего в радиусе 1 км от козьих молочных ферм, был в 46 раз выше, чем на расстоянии 5–10 км [16]. В ходе этой вспышки были изолированы и изучены штаммы *C. burnetii*, выделенные из клапанов сердца пациентов с хронической формой заболевания, из abortированной плаценты коз и овец [9]. Штаммы, выделенные от коз и человека, имели почти одинаковые геномы (восемь точечных мутаций), на этом основании выдвинули предположение, что козы являются источником вспышки лихорадки Ку [8, 9]. Эта крупнейшая вспышка зоонозной инфекции стала возможной при ослаблении ветеринарного контроля, что способствовало созданию условий для эпизотического процесса среди животных и формированию очагов коксиеллеза с последующим заражением и вовлечением в эпидемический процесс обслуживающего персонала ферм по производству козьего сыра. При этом массовость вспышки связана с аэрогенным механизмом заражения населения, проживающего в радиусе нескольких километров по розе ветров от зараженных ферм. Повторение подобного сценария нельзя исключить в дальнейшем.

Таким образом, необходимо учитывать, что при росте количества частных козье-овечьих ферм в Российской Федерации в последние годы, при снижении качества ветеринарного надзора можно прогнозировать рост вспышек коксиеллеза в очагах козье-овечьего типа. В практическом плане для минимизации реализации подобного прогноза необходимым является улучшение координации взаимодействия Роспотребнадзора и Росветнадзора при осуществлении эпизоотолого-эпидемиологического контроля для снижения возможности развития эпидемического процесса.

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

Список литературы

1. Красиков А.П., Рудаков Н.В. Риккетсиозы, коксиеллез и анаплазмозы человека и животных. Омск: ИЦ «Омский научный вестник»; 2013. 280 с.
2. Рудаков Н.В. Очаги лихорадки Ку в условиях антропического воздействия. В кн.: Природноочаговые инфекции (болезни) человека: Респ. сб. науч. работ. Омск; 1990. С. 84–90.
3. Maurin M., Raoult D. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12(4):518–53. DOI: 10.1128/CMR.12.4.518.
4. Parker N.R., Barralet J.H., Bell A.M. Q fever. *Lancet.* 2006; 367(9511):679–88. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68266-4.
5. Arricau Bouvery N., Souriau A., Lechopier P., Rodolakis A. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet. Res.* 2003; 34(4):423–33. DOI: 10.1051/vetres:2003017.
6. Roest H.-J., van Gelderen B., Dinkla A., Frangoulidis D., van Zijderweld F., Rebel J., van Keulen L. Q Fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS One.* 2012; 7(11):e48949. DOI: 10.1371/journal.pone.0048949.
7. Kuley R., Smith H.E., Janse I., Harders F.L., Baas F., Schijlen E., Nabuurs-Franssen M.H., Smits M.A., Roest H.I.J., Bossers A. First complete genome sequence of the dutch veterinary *Coxiella burnetii* strain NL3262, originating from the largest global Q fever outbreak, and draft genome sequence of its epidemiologically linked

- chronic human isolate NLhu3345937. *Genome Announc.* 2016; 4(2):e00245-16. DOI: 10.1128/genomeA.00245-16.
8. Roest H.I., Ruuls R.C., Tilburg J.J., Nabuurs-Franssen M.H., Klaassen C.H., Vellema P., van den Brom R., Dercksen D., Wouda W., Spierenburg M.A., van der Spek A.N., Buijs R., de Boer A.G., Willemse P.T., van Zijderveld F.G. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(4):668-75. DOI: 10.3201/eid1704.101562.
9. Kuley R., Kuijt E., Smits M.A., Roest H.I., Smith H.E., Bossers A. Genome plasticity and polymorphisms in critical genes correlate with increased virulence of dutch outbreak-related *Coxiella burnetii* strains. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1526. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01526.
10. Ensnerink M. Questions abound in Q-Fever explosion in the Netherlands. *Science.* 2010; 327(5963):266-7. DOI: 10.1126/science.327.5963.266-a.
11. Van der Hoek W., Dijkstra F., Schimmer B., Schneeberger P.M., Vellema P., Wijkmans C., ter Schegget R., Hackert V., van Duynhoven Y. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. *Euro Surveill.* 2010; 15(12):19520.
12. Яковлев Э.А., Борисевич С.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В. Заболеваемость лихорадкой Ку в Российской Федерации и странах Европы: реалии и проблемы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2015; 4:49-54. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-49-54.
13. Госманов Р.Г., Юсупов Р.Х. Совершенствование диагностики лихорадки Ку сельскохозяйственных животных. В кн.: Диагностика, профилактика и методы борьбы с туберкулезом животных: науч. тр. КТВИ. Казань; 1985. С. 57-65.
14. Зеликман С.Ю., Березкина Г.В., Рудаков Н.В., Штреек С.В., Нурпейсова А.Х. Серомониторинг лиц профессиональной группы риска по зоонозным бактериальным инфекциям в Омской области. В кн.: Попова А.Ю., Зайцева Н.В., редакторы. Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения: материалы Всерос. науч.-практ. интернет-конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора с междунар. участием. Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та; 2020. С. 186-188.
15. Kampschreuer L.M., Hagenaars J.C., Wielders C.C., Elsman P., Lestrade P.J., Koning O.H., Oosterheert J.J., Renders N.H., Wever P.C. Screening for *Coxiella burnetii* seroprevalence in chronic Q fever high-risk groups reveals the magnitude of the Dutch Q fever outbreak. *Epidemiol. Infect.* 2013; 141(4):847-51. DOI: 10.1017/S0950268812001203.
16. Ladbury G.A., Van Leuken J.P., Swart A., Vellema P., Schimmer B., Ter Schegget R., Van der Hoek W. Integrating interdisciplinary methodologies for one health: goat farm re-implicated as the probable source of an urban Q fever outbreak, the Netherlands, 2009. *BMC Infect. Dis.* 2015; 15:372. DOI: 10.1186/s12879-015-1083-9.
- References**
- Krasikov A.P., Rudakov N.V. Rickettsioses, coxiellosis and anaplasmosis in humans and animals. Omsk: IC "Omsk Scientific Bulletin"; 2013. 280 p.
 - Rudakov N.V. Foci of Q fever under anthropic influence. In: [Natural-Focal Human Infections]. Rep. Collection of Scientific Works. Omsk; 1990. P. 84-90.
 - Maurin M., Raoult D. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12(4):518-53. DOI: 10.1128/CMR.12.4.518.
 - Parker N.R., Barralet J.H., Bell A.M. Q fever. *Lancet.* 2006; 367(9511):679-88. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68266-4.
 - Arricau Bouvery N., Souriau A., Lechopier P., Rodolakis A. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet. Res.* 2003; 34(4):423-33. DOI: 10.1051/vetres:2003017.
 - Roest H.-J., van Gelderen B., Dinkla A., Frangoulidis D., van Zijderveld F., Rebel J., van Keulen L. Q Fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS One.* 2012; 7(11):e48949. DOI: 10.1371/journal.pone.0048949.
 - Kuley R., Smith H.E., Janse I., Harders F.L., Baas F., Schijlen E., Nabuurs-Franssen M.H., Smits M.A., Roest H.I.J., Bossers A. First complete genome sequence of the Dutch veterinary *Coxiella burnetii* strain NL3262, originating from the largest global Q fever outbreak, and draft genome sequence of its epidemiologically linked chronic human isolate NLhu3345937. *Genome Announc.* 2016; 4(2):e00245-16. DOI: 10.1128/genomeA.00245-16.
 - Roest H.I., Ruuls R.C., Tilburg J.J., Nabuurs-Franssen M.H., Klaassen C.H., Vellema P., van den Brom R., Dercksen D., Wouda W., Spierenburg M.A., van der Spek A.N., Buijs R., de Boer A.G., Willemse P.T., van Zijderveld F.G. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(4):668-75. DOI: 10.3201/eid1704.101562.
 - Kuley R., Kuijt E., Smits M.A., Roest H.I., Smith H.E., Bossers A. Genome plasticity and polymorphisms in critical genes correlate with increased virulence of Dutch outbreak-related *Coxiella burnetii* strains. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1526. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01526.
 - Ensnerink M. Questions abound in Q-Fever explosion in the Netherlands. *Science.* 2010; 327(5963):266-7. DOI: 10.1126/science.327.5963.266-a.
 - Van der Hoek W., Dijkstra F., Schimmer B., Schneeberger P.M., Vellema P., Wijkmans C., ter Schegget R., Hackert V., van Duynhoven Y. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. *Euro Surveill.* 2010; 15(12):19520.
 - Yakovlev E.A., Borisovich S.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V. The incidence of Q fever in the Russian Federation and European countries: realities and problems. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii. [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2015; 4:49-54. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-49-54.
 - Gosmanov R.G., Yusupov R.Kh. Improving the diagnosis of Q fever in farm animals. In: [Diagnostics, Prevention, and Methods of Control of Tuberculosis in Animals]. Kazan; 1985. P. 57-65.
 - Zelikman S.Yu., Berezhkina G.V., Rudakov N.V., Shtrek S.V., Nurpeissova A.Kh. Seromonitoring of persons under occupational risk of zoonotic bacterial infections in the Omsk region. In: [Popova A.Yu., Zaitseva N.V., editors. Fundamental and Applied Aspects of Public Health Risk Analysis: Proceedings of the All-Russian scientific and practical internet conference for young scientists and specialists of the Rosprobrenadzor with international participation]. Perm': Publishing House of the "Perm National Research Polytechnical University", 2020. P. 186-188.
 - Kampschreuer L.M., Hagenaars J.C., Wielders C.C., Elsman P., Lestrade P.J., Koning O.H., Oosterheert J.J., Renders N.H., Wever P.C. Screening for *Coxiella burnetii* seroprevalence in chronic Q fever high-risk groups reveals the magnitude of the Dutch Q fever outbreak. *Epidemiol. Infect.* 2013; 141(4):847-51. DOI: 10.1017/S0950268812001203.
 - Ladbury G.A., Van Leuken J.P., Swart A., Vellema P., Schimmer B., Ter Schegget R., Van der Hoek W. Integrating interdisciplinary methodologies for one health: goat farm re-implicated as the probable source of an urban Q fever outbreak, the Netherlands, 2009. *BMC Infect. Dis.* 2015; 15:372. DOI: 10.1186/s12879-015-1083-9.

Authors:

Шпунов С.Н., Рудаков Н.В., Зеликман С.Ю. Омск Research Institute of Natural-Focal Infections; 7, Prospect Myra, Omsk, 644080, Russian Federation; e-mail: mail@onipi.org. Omsk State Medical University; 12, Lenina St., Omsk, 644099, Russian Federation.

Об авторах:

Шпунов С.Н., Рудаков Н.В., Зеликман С.Ю. Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций; Российская Федерация, 644080, Омск, пр-т Мира, 7; e-mail: mail@onipi.org. Омский государственный медицинский университет; Российская Федерация, 644099, Омск, ул. Ленина, 12.

К ЮБИЛЕЮ ЛЮДМИЛЫ ПАВЛОВНЫ АЛЕКСЕЕВОЙ

28 октября 2021 г. – юбилей Людмилы Павловны Алексеевой, профессора, доктора биологических наук, главного научного сотрудника отдела диагностических препаратов Ростовского-на-Дону противочумного института.

Людмила Павловна занимается фундаментальными и прикладными исследованиями в области микробиологии возбудителей особо опасных инфекций, является родоначальником развития и внедрения в лабораторную практику принципиально нового методического направления – гибридной технологии. Основное направление научной деятельности Л.П. Алексеевой – применение моноклональных антител как эффективного инструмента для изучения эпипотного состава антигенов возбудителей инфекционных болезней с целью выявления протективных и специфических антигенных детерминант, на основе которых разрабатываются новые диагностические препараты и совершенствуются методы лабораторной диагностики. Другим важным направлением исследований стало внедрение модели клеточных культур животного и человеческого



происхождения для оценки токсичности биологически активных веществ, производимых возбудителями особо опасных инфекций, как альтернативы классическим тестам на экспериментальных животных.

Под руководством Людмилы Павловны выполнено и защищено 12 кандидатских диссертаций, некоторые из учеников продолжают дело своего учителя, работая в институте. По результатам научно-исследовательской деятельности Л.П. Алексеевой опубликовано более 300 научных работ, нормативно-технических и методических документов, получены авторские свидетельства и патенты. За изобретательскую и рационализаторскую деятельность Людмила Павловна награждена знаком «Изобретатель СССР», а также отмечена серебряной медалью ВДНХ за разработанный диагностический препарат.

Коллектив Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института от всей души поздравляет юбиляра с торжественной датой и желает доброго здоровья, счастья, благополучия и новых творческих успехов!

К ЮБИЛЕЮ ЭЛЬЗЫ АФАНАСЬЕВНЫ МОСКВИТИНОЙ

25 сентября 2021 г. – юбилей Эльзы Афанасьевны Москвитиной, профессора, доктора медицинских наук, главного научного сотрудника отдела эпидемиологии Ростовского-на-Дону противочумного института.

Э.А. Москвитина – один из ведущих специалистов по эпидемиологии холеры и других особо опасных инфекций, санитарной охране территории. Основные направления ее научной деятельности: разработка и внедрение принципов районирования административных территорий Российской Федерации по типам эпидемических проявлений холеры; изучение эпидемиологии, оптимизация эпидемиологического надзора за такими особо опасными инфекциями, как холера, туляремия, Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Западного Нила, с использованием современных теорий и концепций, проблемно ориентированных баз данных, ГИС; определение факторов эпидемиологического риска, способствующих активизации эпидемического процесса. Неоднократно участвовала в организации и проведении оперативного эпидемиологического анализа и других противоэпидемических мероприятий при ликвидации вспышек и эпидемии



холеры (Одесская область, Украина, 1981 г.; Республика Дагестан, 1994 г.; Республика Татарстан, 2001 г.; Ростовская область, 2005 г.), других особо опасных инфекций. Под руководством профессора Э.А. Москвитиной выполнено и защищено семь кандидатских и одна докторская диссертации. Она – автор (соавтор) свыше 400 научных публикаций, 7 монографий, 2 руководств, 9 баз данных и 2 ГИС, более 10 нормативно-методических документов федерального уровня. Эльза Афанасьевна является членом координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории РФ, диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб». Э.А. Москвитина имеет награды Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Коллектив Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института сердечно поздравляет юбиляра с торжественной датой и желает доброго здоровья, счастья, благополучия и новых творческих успехов!

**ПАМЯТИ НИНЫ ПАНТЕЛЕЙМОНОВНЫ БУРАВЦЕВОЙ
(1933–2021 гг.)**

27 сентября 2021 г. после стремительной тяжелой болезни на 89-м году ушла из жизни Нина Пантелеймоновна Буравцева, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, специалист с мировой известностью в области эпидемиологии, микробиологии, иммунологии сибирской язвы и других особо опасных и природно-очаговых инфекционных болезней.

Вся ее профессиональная деятельность была неразрывно связана с противочумной системой нашей страны и направлена на обеспечение ее санитарно-эпидемиологического благополучия.

Ставропольскому научно-исследовательскому противочумному институту отданы 64 года ее активной трудовой и научной деятельности, из которых 54 года были посвящены лаборатории сибирской язвы, в течение 23 лет она возглавляла эту лабораторию, а в последние годы активно работала в должности главного научного сотрудника.

С ее именем связана разработка двух новых эффективных вакцин против сибирской язвы, диагностических люминесцентных сывороток и питательных дифференциально-диагностических сред для выделения сибириеязвенного микробы, руководств по лечению и профилактике сибирской язвы, тест-системы для определения антител к возбудителю сибирской язвы и серии атласов-кастров стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов в субъектах Российской Федерации. Ниной Пантелеймоновной разработаны научно-методиче-



ские подходы к эпидемиологическому расследованию, организации и проведению противоэпидемических мероприятий по сибирской язве, которые постоянно совершенствовались. Нина Пантелеймоновна принимала непосредственное участие в ликвидации многих вспышек сибирской язвы на Кавказе: в Карачаево-Черкесской Республике (1992 г.), Кабардино-Балкарской Республике (1993 г.), Ставропольском крае (1998 г.), Республике Северная Осетия – Алания (2007 г.). Данный опыт работы нашел отражение в ее монографии «Сибирская язва на Северном Кавказе». Н.П. Буравцева – автор более 30 методических документов и инструкций, 14 патентов на изобретение, 3 регламентов производства и ВФС, 350 научных статей.

Ее труд отмечен медалями «За трудовую доблесть», «Ветеран труда», значком «Отличнику здравоохранения», грамотами Минздрава России, в 1996 г. ей присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации».

Как заведующей лабораторией, Нине Пантелеймоновне удалось создать в коллективе творческую рабочую атмосферу, что способствовало подготовке и защите под ее руководством и при ее консультировании диссертаций 5 докторов и 15 кандидатов наук.

Нина Пантелеймоновна навсегда останется в памяти сотрудников Ставропольского противочумного института как настоящий ученый, профессионал, доброжелательный наставник, яркая личность и верный товарищ.