

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Научно-практический журнал

Выходит четыре раза в год

Основан в 1968 году

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

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

Выпуск 4

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. 4. 158 с.

Подписано в печать 24.12.2021
Формат 60×84 1/8
Бумага мелованная
Печать офсетная
Усл. печ. л. 18,4
Гарнитура Таймс. Заказ 162-22/180122

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)
Сергиев В.П., докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)
Топорков А.В., докт. мед. наук (Волгоград, Россия)

ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

Абдикаримов С.Т., докт. мед. наук, доцент (Бишкек, Кыргызстан)
Мотин В.Л., профессор (Галвестон, США)
Скурник М., профессор (Хельсинки, Финляндия)
Титов Л.П., докт. мед. наук, профессор, член-корр. НАН Беларуси,
иностранн. 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 (Гвинея, 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 4

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

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

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

Editorial Council

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

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

Editorial Board

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

Meka-Mechenko T.V., Doctor of Medical Science (Almaty, Kazakhstan)
Mikero A.N., Doctor of Biological Science (Saratov, Russia)
Pen'evskaya N.A., Doctor of Medical Science, Associate Professor (Omsk, Russia)
Popov N.V., Doctor of Biological Science, Professor (Saratov, Russia)
Sayapina L.V., Doctor of Medical Science (Moscow, Russia)
Smirnova N.I., Doctor of Biological Science, Professor (Saratov, Russia)
Shemyakin I.G., Doctor of Biological Science, Professor (Obolensk, Russia)
Shcherbakova S.A., Doctor of Biological Science (Saratov, Russia)
Toporkov V.P., Doctor of Medical Science, Professor (Saratov, Russia)
Tserennorov Damdindorj, Ph. D. (Ulaanbaatar, Mongolia)
Usenbaev N.T., Ph. D (Bishkek, Kyrgyzstan)

Editorial Office Address:

46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation
Tel +7(845-2) 51-82-22. Fax +7(845-2) 51-52-12. E-mail: jour@microbe.ru.
<http://journal.microbe.ru>

Обзоры

- Аронова Н.В., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Головин С.Н., Анисимова А.С.** Роль везикул наружных мембран возбудителей особо опасных инфекций в патогенезе и иммуногенезе инфекционного процесса 6
- Иванова А.В., Удовиченко С.К., Шиянова А.Е., Дмитриева Л.Н., Пospelov М.В., Касьян Ж.А., Зимирова А.А.** Распространение инфекционных болезней, значимых для санитарной охраны территории Российской Федерации, в Европейском регионе ВОЗ 16
- Касьян Ж.А., Найденова Е.В., Проскурякова М.В., Михеева Е.А., Trinh Van Toan, Bui Thi Thanh Nga, Vo Viet Cuong, Кутырев В.В.** Распространение арбовирусов во Вьетнаме 27
- Кретенчук О.Ф.** Отечественные средства диагностики особо опасных инфекций на основе моноклональных антител 35

Оригинальные статьи

- Вагайская А.С., Трунякова А.С., Комбарова Т.И., Дентовская С.В.** Моделирование экспериментальной чумы в условиях лаборатории уровня биобезопасности 2 46
- Василенко Н.Ф., Прислегина Д.А., Цапко Н.В., Волынкина А.С., Семенко О.В., Ашибокров У.М., Тохов Ю.М., Малецкая О.В., Куличенко А.Н.** Современное состояние популяций позвоночных животных и их роль в поддержании природных очагов зоонозов на территории Ставропольского края 54
- Дубянский В.М., Халидов А.Х.** Эколого-эпизоотологическая дифференциация природных очагов чумы 62
- Дугаржапова З.Ф., Ивачева М.А., Чеснокова М.В., Кравец Е.В., Решетняк Е.А., Уманец А.А., Детковская Т.Н., Кузин Д.Ю., Балахонов С.В.** Сибирская язва в Приморском крае (1919–2020 гг.). Сообщение 2. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация и районирование административных территорий 67
- Кошкидько А.Г., Курчева С.А., Жарникова И.В., Зайцев А.А., Гнусарева О.А., Старцева О.Л., Газиева А.Ю., Жданова Е.В., Жарникова Т.В., Русанова Д.В.** Оценка применения эритроцитарного диагностикума (лиофилизата) при выявлении возбудителя туляремии в природных очагах 79
- Ларионова Л.В., Писанов Р.В., Симакова Д.И., Наркевич А.Н., Архангельская И.В.** Полимерный иммуноглобулиновый диагностикум для определения холерного токсина и оценки уровня его продукции вибрионами 84
- Никифоров К.А., Куклева Л.М., Ситмбетов Д.А., Осина Н.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В.** Конструирование набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» 90
- Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Банцевич М.Д., Филипович-Вигньевич С.Б., Зуева Е.Б., Васильева Г.В., Заря Я.В., Сайтгалина М.А., Иванова А.Р., Жабасова А.С., Тотолян Арег А.** Характеристика связанных с HBsAg-негативной формой заболевания мутаций вируса гепатита В у пациентов гемодиализных центров 96

Reviews

- Aronova N.V., Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V., Golovin S.N., Anisimova A.S.** The Role of Outer Membrane Vesicles of Agents of Particularly Dangerous Infections in the Pathogenesis and Immunogenesis of Infectious Process 6
- Ivanova A.V., Udovichenko S.K., Shiyanova A.E., Dmitrieva L.N., Pospelov M.V., Kas'yan Zh.A., Zimirova A.A.** Distribution of Infectious Diseases Significant for Sanitary Protection of the Territory of the Russian Federation in the WHO European Region 16
- Kas'yan Zh.A., Naidenova E.V., Proskuryakova M.V., Mikheeva E.A., Trinh Van Toan, Bui Thi Thanh Nga, Vo Viet Cuong, Kutyrev V.V.** Prevalence of Arboviruses in Vietnam 27
- Kretenchuk O.F.** Domestically-Produced Monoclonal Antibody-Based Means of Diagnosing Particularly Dangerous Infections 35

Original articles

- Vagaiskaya A.S., Trunyakova A.S., Kombarova T.I., Dентовskaya S.V.** Simulation of Bubonic Plague in BSL-2 Laboratory 46
- Vasilenko N.F., Prislegina D.A., Tsapko N.V., Volynkina A.S., Semenko O.V., Ashibokov U.M., Tokhov Yu.M., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N.** The Current State of the Vertebrate Animals Populations and their Role in the Persistence of Natural Zoonoses Foci in the Stavropol Territory 54
- Dubyansky V.M., Khalidov A.Kh.** Ecological-Epizootiological Differentiation of Natural Plague Foci 62
- Dugarzhapova Z.F., Ivacheva M.A., Chesnokova M.V., Kravets E.V., Reshetnyak E.A., Umanets A.A., Detkovskaya T.N., Kuzin D.Yu., Balakhonov S.V.** Anthrax in Primorsky Territory (1919–2020). Communication 2. Epizootiological-Epidemiological Situation and Zoning of Administrative Territories 67
- Koshkid'ko A.G., Kurcheva S.A., Zharnikova I.V., Zaitsev A.A., Gnosareva O.A., Startseva O.L., Gazieva A.Yu., Zhdanova E.V., Zharnikova T.V., Rusanova D.V.** Assessment of the Application of Erythrocytal Diagnosticum (Lyophilizate) in Detecting Tularemia Agent in Natural Foci 79
- Larionova L.V., Pisanov R.V., Simakova D.I., Narkevich A.N., Arkhangel'skaya I.V.** Polymeric Immunoglobulin Diagnosticum for Detection of Cholera Toxin and Assessing the Level of Its Production by Vibrios 84
- Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sitmbetov D.A., Osina N.A., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V.** Construction of the Reagent Panel "GenPest-subspecies/Altai-RGF" 90
- Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Semenov A.V., Bancevic M.D., Filipovic-Vignjevic S.B., Zueva E.B., Vasil'eva G.V., Zarya Ya.V., Saitgalina M.A., Ivanova A.R., Zhabasova A.S., Totolian Areg A.** Profile of Hepatitis B Virus Mutations Associated with HBsAg-Negative Disease in Patients of Hemodialysis Centers 96

Рубис Л.В. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по туляремии на территории Республики Карелия.....	105	Rubis L.V. Epizootiological and Epidemiological Situation on Tularemia in the Republic of Karelia	
Рязанова А.Г., Герасименко Д.К., Буравцева Н.П., Мезентцев В.М., Логвин Ф.В., Головинская Т.М., Семенова О.В., Аксенова Л.Ю., Перехожева С.В., Чмеренко Д.К., Куличенко А.Н. Применение геоинформационных технологий для оценки эпизоотологической и эпидемиологической обстановки по сибирской язве в Волгоградской области.....	112	Ryazanova A.G., Gerasimenko D.K., Buravtseva N.P., Mezentsev V.M., Logvin F.V., Golovinskaya T.M., Semenova O.V., Aksenova L.Yu., Perekhozheva S.V., Chmerenko D.K., Kulichenko A.N. Application of Geoinformation Technologies for Assessment of the Epizootiological and Epidemiological Situation on Anthrax in the Volgograd Region	
Савельев В.Н., Куличенко А.Н., Савельева И.В., Ковалев Д.А., Таран Т.В., Подопригора Е.И., Сосунов В.В., Радаева Т.В. Тест-система для идентификации типичных и генетически измененных вариантов холерных вибрионов биовара Эль Тор методом ПЦР в режиме реального времени.....	120	Savel'ev V.N., Kulichenko A.N., Savel'eva I.V., Kovalev D.A., Taran T.V., Podoprighora E.I., Sosunov V.V., Radaeva T.V. Test-System for Identification of Typical and Genetically Altered Variants of Cholera Vibrios, Biovar El Tor, Using Real-Time PCR	
Сайфуллин М.А., Кольцова Е.А., Симонова Я.А., Макиев Е.А., Климова Е.А., Пылаева Е.Ю., Зверева Н.Н., Пшеничная Н.Ю. Использование средств индивидуальной защиты пассажирами московского метрополитена в условиях пандемии COVID-19.....	128	Saifullin M.A., Kol'tsova E.A., Simonova Ya.A., Makiev E.A., Klimova E.A., Pylaeva E.Yu., Zvereva N.N., Pshenichnaya N.Yu. Use of Personal Protection Equipment by Moscow Subway Passengers under Conditions of COVID-19 Pandemic	
Салихов Р.Р., Борисова С.В., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Волох О.А. Оптимизация условий культивирования <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> в процессе получения клеточной массы.....	137	Salikhov R.R., Borisova S.V., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I., Volokh O.A. Optimization of the Conditions for Cultivation of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> in the Process of Obtaining Cell Mass	
Семенова А.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Пьянков С.А., Шульгина И.С., Таранов О.С., Пьянков О.В., Антонен Д.В., Карпенко Л.И., Старостина Е.В., Боргоякова М.Б., Чикаев А.Н., Гаврилова Е.В., Максюттов Р.А., Кочнева Г.В. Иммуногенные и протективные свойства рекомбинантного штамма вируса осповакцины, экспрессирующего кассету генов структурных белков вируса Марбурга.....	143	Semenova A.V., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., P'yankov S.A., Shul'gina I.S., Taranov O.S., P'yankov O.V., Antonets D.V., Karpenko L.I., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Chikaev A.N., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Kochneva G.V. Immunogenic and Protective Features of the Recombinant Vaccinia Virus Strain Expressing Cassette of Genes of Marburg Virus Structural Proteins	
Яшина Л.Н., Трегубчак Т.В., Малышев Б.С., Сметанникова Н.А., Грищенко И.В., Дольский А.А., Швалов А.Н., Зайковская А.В., Казанцев А.В., Чекашов В.Н., Красовская Т.Ю. Возбудитель вспышки ГЛПС в Саратовской области, 2019 г.	150	Yashina L.N., Tregubchak T.V., Malyshev B.S., Smetannikova N.A., Grishchenko I.V., Dol'sky A.A., Shvalov A.N., Zaykovskaya A.V., Kazantsev A.V., Chekashov V.N., Krasovskaya T.Yu. Hantavirus Associated with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Outbreak in the Saratov Region in 2019	
Юбилей		Anniversary	
К юбилею Сергея Владимировича Балахонova	157	To the Anniversary of Sergey V. Balakhonov	
Памяти коллеги		Revering the Memory of the Colleague	
Памяти Ирины Александровны Щипелевой.....	158	Of blessed memory of Irina A. Shchepeleva	

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-6-15

УДК 616.9:612.017.1

Н.В. Аронова¹, Н.В. Павлович¹, М.В. Цимбалистова¹, С.Н. Головин², А.С. Анисимова¹

РОЛЬ ВЕЗИКУЛ НАРУЖНЫХ МЕМБРАН ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ПАТОГЕНЕЗЕ И ИММУНОГЕНЕЗЕ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

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

²ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

В обзоре проведен анализ литературы, посвященной современным представлениям о феномене везикуляции и его биологической роли у патогенных бактерий – возбудителей особо опасных инфекций человека. Обобщены данные о продукции, строении, композиционном составе и функциях везикул наружных мембран (OMV – outer membrane vesicles) бактерий. В последние годы резко возрос интерес исследователей к образованию сферических структур (так называемых пузырьков или везикул) из внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Такие структуры окружены двойным слоем фосфолипидной мембраны, внешний слой которой обогащен молекулами липополисахарида. Внутреннее пространство везикул может включать различные антигены, рецепторы, адгезины, токсины, ферменты, порины и др. Образование везикул наружными мембранами бактерий признано нормальным физиологическим проявлением жизнедеятельности бактерий, направленным на адаптацию к условиям окружающей среды. Изучение биологической роли OMV показало их связь с патогенезом и иммуногенезом заболеваний бактериальной природы. В обзоре приведены сведения об особенностях индукции, композиционном составе OMV и их участии в процессах пато- и иммуногенеза тяжелых инфекций, обусловленных ПБА I–II групп – грамотрицательными возбудителями чумы, туляремии, бруцеллеза, сапа, мелиоидоза, холеры, а также о формировании экстрацеллюлярных везикул у грамположительного возбудителя сибирской язвы. Особое внимание в обзоре уделено проблеме разработки безопасных и эффективных вакцинных препаратов нового поколения на основе бактериальных везикул.

Ключевые слова: везикулы наружной мембраны, особо опасные инфекции, патогенез, иммуногенез, вакцины.

Корреспондирующий автор: Аронова Надежда Валентиновна, e-mail: info@tularemia.ru.

Для цитирования: Аронова Н.В., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Головин С.Н., Анисимова А.С. Роль везикул наружных мембран возбудителей особо опасных инфекций в патогенезе и иммуногенезе инфекционного процесса. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:6–15. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-6-15

Поступила 02.10.2020. Отправлена на доработку 09.11.2020. Принята к публ. 02.04.2021.

N.V. Aronova¹, N.V. Pavlovich¹, M.V. Tsimbalistova¹, S.N. Golovin², A.S. Anisimova¹

The Role of Outer Membrane Vesicles of Agents of Particularly Dangerous Infections in the Pathogenesis and Immunogenesis of Infectious Process

¹Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

²Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The literature review is devoted to the modern concepts of the vesiculation phenomenon and its biological role in pathogenic bacteria – causative agents of particularly dangerous human infections. Data on the production, structure, composition, and functions of the outer membrane vesicles (OMV) of bacteria have been summarized. In recent years, the interest of researchers in the formation of spherical structures (so called bubbles or vesicles) from outer membrane of gram-negative bacteria has significantly increased. Such structures are surrounded by the double layer of a phospholipid membrane, the outer layer of which is enriched with lipopolysaccharide molecules. The inner space of vesicles could include various antigens, receptors, adhesins, toxins, enzymes, porins, etc. The formation of vesicles by the outer membranes of bacteria is recognized as a normal physiological manifestation of bacterial activity aimed at adaptation to environmental conditions. The investigation of the biological role of OMV showed their connection with the pathogenesis and immunogenesis of bacterial diseases. The review provides information on the peculiarity of induction, OMV composition and their participation in the processes of patho- and immunogenesis of severe infections caused by groups I–II PBA – the gram-negative causative agents of plague, tularemia, brucellosis, glanders, melioidosis, cholera, and formation of extracellular vesicles in a gram-positive anthrax pathogen. The particular attention is paid to the issue of developing safe and effective next-generation vaccine preparations based on bacterial vesicles.

Key words: outer membrane vesicles, particularly dangerous infections, pathogenesis, immunogenesis, vaccines.

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

Corresponding author: Nadezda V. Aronova, e-mail: info@tularemia.ru.

Citation: Aronova N.V., Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V., Golovin S.N., Anisimova A.S. The Role of Outer Membrane Vesicles of Agents of Particularly Dangerous Infections in the Pathogenesis and Immunogenesis of Infectious Process. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:6–15. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-6-15

Received 02.10.2020. Revised 09.11.2020. Accepted 02.04.2021.

Aronova N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7772-9276>
Pavlovich N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>
Tsimbalistova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4091-649X>

Golovin S.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1929-6345>
Anisimova A.S., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4010-2138>

Исследование патогенеза, иммуногенеза и факторов вирулентности возбудителей особо опасных болезней (ООИ) всегда являлось приоритетным направлением в изучении бактериальных инфекций. Однако, несмотря на достигнутые успехи, некоторые аспекты взаимодействия «паразит – хозяин» до сих пор остаются до конца не выясненными. Сложность изучения этих вопросов обусловлена тем, что вирулентность бактерий реализуется сложным действием целого набора детерминант, экспрессирующихся преимущественно *in vivo*. Большинство известных факторов вирулентности возбудителей особо опасных инфекций: чумы, туляремии, бруцеллеза, холеры и др. – в значительной мере связаны со строением и функциями поверхностных структур бактерий [1, 2]. Так, клеточная стенка бактерий участвует во многих метаболических и биосинтетических процессах, в трансформации энергии и активном транспорте веществ, выполняет рецепторную и барьерную функции. Более того, именно поверхностные структуры микробной клетки осуществляют первый этап взаимодействия с защитными факторами хозяина, модулируя их ответ и обеспечивая свое выживание в неблагоприятных условиях макроорганизма. У многих вирулентных бактерий компоненты наружных мембран ответственны за токсический эффект и развитие тяжелого инфекционного процесса, т.е. они играют важную роль в реализации патогенного потенциала возбудителей инфекционных заболеваний [3].

В последние годы резко возрос интерес исследователей к явлению отшнуровывания от внешней мембраны грамотрицательных бактерий так называемых «пузырьков» или везикул (OMV – outer membrane vesicles), которое в зарубежной литературе получило название «блеббинг». Впервые образование таких структур описано у кишечной палочки и возбудителя холеры в 1966–1967 гг. [4, 5]. В 1999 г. T.J. Beveridge опубликовал работу, где обобщил разрозненные данные и показал существование процесса везикуляции у широкого круга грамотрицательных бактерий [6]. Образование везикул наружной мембраны признали нормальным физиологическим проявлением жизнедеятельности бактерий, не связанным с их деградацией. Дальнейшее изучение биологической роли везикул наружных мембран показало их связь с пато- и иммуногенезом заболеваний бактериальной природы [7–9]. Позже появились работы о наличии блеббинга и у грамположительных бактерий, что свидетельствует об универсальности этого явления для функционирования микробной клетки [10].

Как установлено, везикулы грамотрицательных бактерий представляют собой отпочковывающиеся во внешнюю среду участки наружной мембраны с захватом части периплазматического содержимого [8]. Такие структуры окружены двойным слоем фосфолипидной мембраны, внешний слой которой обога-

щен молекулами липополисахарида (ЛПС). Кроме того, как в составе мембраны, так и во внутреннем пространстве везикулы могут содержать биологически активные молекулы, например различные антигены, токсины, ферменты, порины, адгезины и рецепторы [7, 11]. Ранее считалось, что OMV несут только компоненты мембран и содержимое периплазматического пространства, однако позднее было обнаружено, что в «пузырьках» могут находиться цитоплазматические белки, а также РНК и ДНК микроба [12].

Отделившись от бактериальной клетки, везикулы служат транспортными средствами для передачи факторов колонизации, патогенности и модуляции защитного ответа хозяина. Как показано, OMV осуществляют доставку токсинов к клеткам-мишеням, что является мощным механизмом вирулентности [13]. Преимущества такой системы секреции разнообразны и направлены на максимальную колонизацию экологической ниши, будь то организм хозяина, условия микробного сообщества или окружающей среды. В частности, везикулы создают защиту белковым компонентам (бактериальным ферментам или токсинам) от действия внешних протеаз чужеродного происхождения. Во-вторых, содержимое OMV представляет собой концентрированную форму факторов бактериальной клетки в их нативной конформации и окружении, формируя паттерны биологически активных молекул (PAMPs), что существенно повышает эффективность их воздействия. В-третьих, бактерии могут дистанционно воздействовать на среду обитания, без непосредственного присутствия в точке взаимодействия, что энергетически более выгодно, увеличивает скорость колонизации и обеспечивает большую устойчивость патогена к факторам неспецифической защиты хозяина. Наконец, присутствие на поверхности везикул рецепторов или адгезинов позволяет осуществлять адресное взаимодействие со специфическими мишенями [11].

Образование везикул является регулируемым индуцибельным процессом, направленным на выживание и адаптацию бактерий к изменяющимся условиям среды. При возникновении стрессовых воздействий (обедненная питательная база, изменение температуры, защита от фагов и антимикробных веществ, агрессивная среда макроорганизма) микробы отвечают повышением уровня везикуляции [7]. Следует обратить особое внимание, что при одинаковых условиях у патогенных бактерий процесс везикуляции идет более интенсивно по сравнению с непатогенными микроорганизмами. Так, энтеротоксигенная *Escherichia coli* (ETEC) продуцирует примерно в 10 раз больше везикул, чем непатогенная кишечная палочка [14]. Лейкотоксичные штаммы *Actinobacillus actinomycetemcomitans* образуют в 25 раз больше везикул, чем нелейкотоксичные [15].

Согласно экспериментальным данным некоторых исследователей, в макроорганизме бактерии с гипервезикуляцией имеют существенные преимущества в выживаемости [7].

С помощью формирования и высвобождения везикул из бактериальной клетки значительно возрастает способность патогена к преодолению механизмов природного и адаптивного иммунитета хозяина. Например, связывание нормальных или специфических антител везикулами при инфекционном процессе сопровождается уменьшением опсонизации живых микробов, что приводит к увеличению их резистентности к бактерицидному действию сыворотки и снижению эффективности фагоцитоза [7]. Взаимодействие OMV с клетками хозяина может подавлять нормальный или индуцировать патологический цитокиновый ответ на внедрение инфекционного агента, обеспечивая ему благоприятные условия для пролиферации и приживания в тканях-мишенях [7, 13].

Как установлено, биологическая активность везикул определяется их композиционным составом, который, в свою очередь, зависит как от вида микроорганизма, так и от условий их образования (макроорганизм, питательные среды с различным составом и др.) [7]. Интересно, что бактериальная клетка может варьировать включением тех или иных компонентов в везикулы, обеспечивая либо усугубление тяжести течения инфекционного процесса, либо индукцию выраженного иммунного ответа. Например, фракция ЛПС в составе везикул может обладать повышенным токсическим потенциалом по сравнению с ЛПС бактериальной клетки. В литературе описаны как модификации химической структуры везикулярных ЛПС, так и избирательные включения в OMV более токсичной субпопуляции молекул липополисахарида [7]. Кроме того, «пузырьки» содержат более высокую концентрацию биополимера, являясь как ключевыми источниками ЛПС для активации воспаления, так и «приманками», связывающими растворимые факторы защиты макроорганизма [7, 13]. Показано также, что они могут уменьшать уровень мембраносвязанной экспрессии CD14 на поверхностях макрофагов, приводя к снижению их способности запускать продукцию цитокинов, т.е. непосредственно участвовать в патогенезе инфекции [13].

Разнообразный набор антигенов белковой и липополисахаридной природы, которые несут в себе везикулы, может индуцировать адаптивный иммунитет (образование специфических антител, активацию клеток иммунологической памяти и т.д.). В связи с этим в настоящее время ведутся интенсивные исследования по созданию вакцин на основе бактериальных OMV. Везикулярные препараты обладают еще рядом преимуществ: биобезопасность, внутренняя адъювантность, представление антигенов в максимально нативной конформации и отсутствие воздействия на микробиоту хозяина [16]. Иллюстрацией успехов в этом направлении является разработка и

внедрение в клиническую практику везикулярной вакцины против менингококков [17].

Таким образом, анализ данных литературы убедительно свидетельствует о важном вкладе везикул бактерий в патогенез и иммуногенез инфекционного процесса. В связи с этим актуальным является изучение данного явления у возбудителей особо опасных инфекций человека, многие факторы вирулентности которых до настоящего времени не идентифицированы.

Холера. Наибольшее количество исследований блеббинга у возбудителей особо опасных инфекций относятся к возбудителю холеры – *Vibrio cholerae*. Как уже упоминалось, еще в 1967 г. S.N. Chatterjee и J. Das с помощью электронной микроскопии обнаружили многочисленные выпячивания мембраны у холерных вибрионов и присутствие отпочкованных от мембраны сферических мешочков (sac-like structures) диаметром преимущественно 600–800 Å [5]. Авторы предположили, что этот процесс является секреторным механизмом *V. cholerae* и связан с выделением холерного токсина. В настоящее время установлено, что такие факторы вирулентности холерного вибриона, как холерный токсин и гемолизин, выделяются бактериальной клеткой как в свободном виде через систему секреции 2-го типа, так и ассоциированными с везикулами наружной мембраной [18–20]. Эти способы доставки токсина к мишеням не являются конкурентными, так как реализуются разными механизмами взаимодействия с рецепторами организма хозяина. С помощью OMV *V. cholerae* секретирует и другие биологически активные протеазы, которые могут играть роль в цитотоксических и воспалительных реакциях [21, 22]. Система выделения факторов агрессии с помощью везикул позволяет снизить реакцию макроорганизма на биологически активные молекулы живой микробной клетки, обеспечивая ей преимущества в выживании *in vivo*. Так, например, OMV *V. cholerae* (в том числе и несущие цитолизин) индуцируют продукцию микроРНК miR-146a, которая подавляет реакции врожденного иммунного ответа и предотвращает развитие воспаления в слизистой оболочке кишечника. В противоположность этому, свободная форма токсина, наоборот, выражено стимулирует образование воспалительных факторов, таких как интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухоли-α (TNF-α), CCL20, IL-1β и IRAK2v [23]. Помимо детерминант вирулентности, OMV холерного вибриона содержат белки с другими биологическими функциями: способствующие росту бактериальных клеток, участвующие в кишечной колонизации у кроликов и в образовании матрицы биопленки, а также различные субстраты секреторной системы 2-го типа [24]. OMV *V. cholerae* несут в себе также молекулы ЛПС и РНК [25]. T. Song *et al.* (2008) установили, что процесс формирования везикул у возбудителя холеры может регулироваться посредством малой РНК, получившей название VrrA (*Vibrio* regulatory RNA of OmpA), которая активируется в от-

вет на стресс бактериальной оболочки [26]. Действие этой регуляторной мРНК направлено на подавление производства белка OmpA, что приводит к повышению продукции везикул у холерного вибриона. Другая группа исследователей (F.G. Zingl *et al.*, 2020) установила, что на ранней стадии инфекции у млекопитающих происходит подавление транспортера фосфолипидов VacJ/Yrb, приводящее к стимуляции блеббинга *V. cholerae*. Гипервезикуляция позволяет быстро изменить состав бактериальной мембраны, накапливая в ней модифицированный глицином липополисахарид (ЛПС) и уменьшая количество порина OmpT. Такая адаптация повышает устойчивость бактерий к антимикробным пептидам и желчи, что способствует колонизации кишечника хозяина [27].

Важной функцией везикул холерного вибриона является также их участие в образовании биопленки [28]. Однако роль OMV в экологии *V. cholerae* этим не исчерпывается. Известно, что холерные вибрионы способны выживать и размножаться симбиотически в водной свободноживущей амебе *Acanthamoeba castellanii*, которая может выполнять функцию хозяина для *V. cholerae* в окружающей среде [29]. Согласно данным S.P. Valeru *et al.* (2014), гипервезикулирующий мутант *V. cholerae* с нарушением синтеза белка A (OmpA) наружной мембраны не только достоверно увеличивал выживание вибрионов при совместном культивировании с амебами, но и подавлял жизнеспособность *A. castellanii*, даже при их обработке бесклеточной везикулярной фракцией. Таким образом, OMV могут являться фактором вирулентности для простейших [30]. Кроме того, показано, что везикулы *V. cholerae* могут играть роль ловушек и защищать бактерии от лизиса фагами [31].

Анализ результатов исследований везикул *V. cholerae* позволил определить новое перспективное направление – создание на их основе вакцинного препарата. Активная работа ученых в этой области принесла несомненные успехи. Например, доказано, что иммунизация мышей везикулами наружной мембраны вызывает у них длительный иммунитет, полностью защищающий от повторного заражения [32, 33]. Установлено, что протективные антитела после иммунизации везикулярной вакциной направлены против О-антигена и обеспечивают подавление подвижности вибрионов. Интересно отметить, что для ограничения моторики вибрионов требовались именно антитела типа G [34]. В настоящее время продолжается работа по поиску способов снижения нежелательных эффектов OMV-вакцины *V. cholerae*. Как уже обнаружено, обработка препарата ретиноидной кислотой уменьшала токсические и воспалительные реакции на везикулярную вакцину, но не влияла на ее иммуногенность [35].

Чума. В отличие от холерного вибриона, данные о роли везикуляции в жизнедеятельности других возбудителей особо опасных инфекций весьма ограничены. Возможно, это объясняется трудностями изучения внутриклеточных инфекционных агентов,

которыми являются возбудители чумы, туляремии, бруцеллеза, сапа и мелиоидоза. Например, только относительно недавно описана продукция везикул наружной мембраны у чумного микроба [36, 37]. Как оказалось, *Yersinia pestis* образует везикулы со средним размером около 100 нм, содержащие связанные с вирулентностью белки наружной мембраны, в том числе адгезин Ail, внешний фимбриальный F1-антиген и каталитически активную протеазу Pla, которая способна активировать плазминоген и деградацию α 2-антиплазмина [37]. J.L. Eddy *et al.* (2014) показали, что количество белков, ассоциированных с OMV, высвобождаемых *Y. pestis*, значительно повышается при 37 °C по сравнению с 26 °C, а также увеличивается в ответ на мембранный стресс и мутации в генах, кодирующих RseA, Hfq и липопротеин Брауна (Lpp). Кроме того, авторы показали, что OMV *Y. pestis* способны связываться с компонентами внеклеточного матрикса, такими как фибронектин и ламинин. Эти данные предполагают, что *Y. pestis* может продуцировать OMV во время инфекции млекопитающих, а секреция Pla через высвобождение OMV способна оказывать влияние на исход инфекции посредством взаимодействий с такими субстратами Pla, как плазминоген и лиганд Fas [37]. Установлено также достоверное повышение везикуляции у чумного микроба при воздействии таких неблагоприятных факторов, как бактериофаг Покровской и гентамицин [38].

В настоящее время проводятся исследования по созданию на основе везикул противочумного вакцинного препарата [39, 40]. Одна из вакцин разрабатывается на основе высокостабильных микровезикул безвредной комменсальной бактерии человека *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bt). Рекомбинантный штамм Bt специально сконструирован для экспрессии основных протективных антигенов возбудителя чумы – фракции 1 (F1) и LcrV (V-антигена). Исследователи показали, что везикулы полученного штамма Bt стабильно содержали F1 в мембранном слое и V-антиген в их просвете. Более того, антигены представлены в активной иммуногенной форме, так как введение вакцинных OMV интраназально приматам (*Macaca fascicularis*) вызывало нарастание титра специфических иммуноглобулинов IgG в крови и IgA в верхних и нижних дыхательных путях. Пул выявленных антител содержал фракцию, обладающую бактерицидными свойствами в отношении *Y. pestis*. Вакцинный препарат также характеризовался высокой стабильностью, термостойкостью и возможностью безыгольной доставки [39]. Другим перспективным вакцинным кандидатом является препарат везикул из мутантного гипервезикулирующего штамма чумного микроба, содержащего адъювантный малотоксичный липид A (монофосфорил липид A, MPLA). Помимо этого, авторы повысили иммуногенность мутанта с помощью введения плазмидного вектора, повышающего продукцию LcrV-антигена *Y. pestis* и уменьшающего количество

мышинного токсина и активатора плазминогена Pla. Вакцинация OMV, содержащими MPLA и повышенное количество LcrV, стимулировала клеточный и гуморальный иммунный ответ, а также обеспечивала полную защиту мышей от подкожного заражения $8 \cdot 10^5$ КОЕ и интраназального заражения вирулентным *Y. pestis* $5 \cdot 10^3$ КОЕ [40].

Туляремия. *Francisella tularensis* является возбудителем тяжелого заболевания широкого круга хозяев, включая человека. Однако, несмотря на многолетние исследования, вопросы высокой патогенности туляремиального микроба открыты, а факторы вирулентности не идентифицированы. До настоящего времени остается проблемным вопрос о том, что при скудной обсемененности организма кролика животные погибают от заражения 1 м.к. *F. tularensis* subsp. *tularensis* (*nearctica*) [41]. В связи с этим одним из подходов к решению проблемы может быть выяснение роли везикул туляремиального микроба в патогенезе и иммуногенезе туляремиальной инфекции. Большинство исследований везикул франциселл выполнены на слабопатогенном подвиде *F. tularensis* subsp. *novicida* или вакцинном штамме *F. tularensis* [42–44]. Отличительной особенностью продукции везикул туляремиального микроба является наличие двух видов OMV. Показано, что бактерии формируют не только сферические OMV, характерные для многих микробов, но и нетипичные палочковидные структуры, обозначаемые как tubes. Биологическая роль этих образований в настоящее время точно не установлена, однако, предположительно, они могут играть роль при взаимодействии с клетками хозяина [43]. Результаты наших экспериментов по изучению продукции везикул возбудителем туляремии при различных условиях культивирования (питательные среды, температура выращивания) подтвердили образование у *F. tularensis* мембранных образований в виде сфер и трубочек.

Согласно данным W.D. McCaig *et al.* (2013), процесс образования везикул у франциселл и их состав являются регулируемыми и зависят от фазы роста культуры, среды выращивания, наличия клеток хозяина и других факторов [43]. Исследования регуляции образования OMV показали, что дефицит цистеина и других незаменимых аминокислот приводит к повышенному блеббингу, тогда как гиповезикулирующие мутанты являются дефектными в ответе на этот сигнал. Таким образом, аминокислотное голодание, с которым сталкивается франциселла во время инвазии в клетке хозяина, может регулировать выработку этих мембранных структур [45]. Интересные данные получены С. Siebert *et al.* (2019), которые обнаружили, что нарушение утилизации железа (делеция в гене *fupA/B*, кодирующим Fer-Utilization Protein) приводит к повышенному образованию везикул и резистентности к фторхинолонам и гентамицину как у мутанта вакцинного штамма (*F. tularensis* LVS), так и у мутанта высоковирулентного штамма subsp. *tularensis* Schu [46]. На модели дефектного по

утилизации железа штамма LVS авторы показали, что везикулы являются ключевым элементом формирования биопленки, которая и обеспечивает, по их мнению, антибиотикоустойчивость к хинолонам и, возможно, персистенцию возбудителя [46]. OMV туляремиального микроба содержат большое количество биологически активных молекул: ЛПС, различные ферменты, а также белки, участвующие в процессах патогенеза и выживания внутри клеток хозяина [42, 43, 47]. Например, липаза FtlA *F. tularensis* с доказанной ролью в инфицировании клеток хозяина *in vivo* секретируется во внеклеточную среду как компонент везикул наружной мембраны [47]. При дальнейшем анализе с помощью электронной микроскопии установлено, что FtlA-содержащие OMV прикреплены к мембране клетки-хозяина. Эти данные свидетельствуют о том, что липаза FtlA способствует адгезии и проникновению *F. tularensis* внутрь клеток макроорганизма [47]. Важная роль везикул в развитии патогенеза туляремиальной инфекции продемонстрирована в опубликованной в 2019 г. работе J. Klimentova *et al.* [48]. При моделировании условий среды макроорганизма во время воспаления (высокая температура и низкий pH) авторы наблюдали у клинического изолята *F. tularensis* subsp. *holarctica* увеличение в несколько раз скорости образования везикул и значительное изменение содержания белка. Протеомный анализ показал, что в композиции белков, избирательно включенных в состав везикул в ответ на стрессовые условия, присутствуют известные факторы вирулентности *F. tularensis*, связанные с внутриклеточным переносом этих бактерий. Выраженные изменения также наблюдались в количестве белков, участвующих в биосинтезе и метаболизме структурных компонентов ЛПС (О-антигена, липида А), фосфолипидов и жирных кислот [48].

В настоящее время предпринимаются попытки получения бесклеточной туляремиальной везикулярной вакцины, где в качестве продуцента предложен гипervезикулирующий мутант *E. coli*, в который рекомбинирован 17-kb кластер генов от *F. tularensis* subsp. *tularensis* (тип А) Schu S4 [49]. Авторами получены везикулы, несущие на своей поверхности О-полисахарид туляремиального микроба, который является как фактором вирулентности туляремиального микроба, так и специфическим антигеном, индуцирующим В-клеточный ответ. Иммунизация мышей BALB/c препаратом вызывала индукцию сывороточных антител IgG и IgA дыхательного тракта, специфичных к О-полисахариду *F. tularensis*. Более того, зарегистрированы увеличение средней продолжительности жизни животных при заражении *F. tularensis* Schu S4 и полная защита при заражении вакцинным штаммом [49].

Бруцеллез. Везикулы у бруцелл впервые были обнаружены С. Gamaso *et al.* в 1987 г. [50], однако роль OMV в жизнедеятельности этих микроорганизмов до сих пор изучена недостаточно. Так, в диссертационной работе М.М. Сальниковой (2013) показа-

но, что в ответ на действие тетрациклина вакцинный штамм *Brucella abortus* 82 отвечает повышенной везикуляцией, позволяющей ему приспособиться к негативному воздействию антибиотика и сохранить жизнеспособность. Имеются данные о том, что кроме адаптации к факторам внешней среды везикулы *B. abortus* способствуют интернализации бактерий в человеческие моноциты и подавляют их врожденный иммунный ответ, что, несомненно, способствует длительной персистенции бруцелл в клетках хозяина [51]. Некоторые исследователи предполагают, что везикулы наружной мембраны могут участвовать в проявлении гестационных осложнений бруцеллеза [52].

При изучении композиционного состава ОМВ бруцелл с помощью протеомного анализа показано наличие в их составе широкого спектра известных белков-иммуногенов [53]. Установлена также важная роль включения полноценного ЛПС в состав везикул, что обеспечивает им устойчивость к агрессивным факторам среды и сохранение иммуногенного потенциала ОМВ [54]. Разным исследовательским группам удалось доказать, что везикулы как *B. melitensis*, так и *B. abortus* стимулировали индукцию иммунных реакций у мышей: пролиферативный ответ и продукцию IFN γ спленоцитами, выработку высоких титров специфических антител, реакции клеточного иммунитета и протекцию от заражения вирулентными штаммами [55–57]. Поэтому ОМВ бруцелл являются перспективными кандидатами для создания противобруцеллезной вакцины.

Сап и мелиоидоз. *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* – возбудители таких тяжелых заболеваний человека, как сап и мелиоидоз, патогенетические особенности которых изучены недостаточно. В последние годы появились работы, посвященные изучению процессов везикуляции у этих бактерий. Как установлено, везикулы *B. pseudomallei* имеют размер от 50 до 250 нм и содержат ЛПС, капсульный полисахарид и разнообразные белки, в том числе и иммуногенные [58], что дало основания рассматривать их в качестве вакцинных кандидатов. В настоящее время не существует лицензированной вакцины против сапа и мелиоидоза, поэтому ее разработка весьма актуальна. Результаты экспериментов продемонстрировали, что иммунизация мышей и макак-резусов везикулами *B. pseudomallei* индуцирует выработку у них специфических защитных антител и клеточного иммунитета, а также обеспечивает значительную защиту мышей от аэрозольного заражения и острого летального сепсиса [59, 60]. На модели макак-резусов было продемонстрировано, что везикулярная вакцина, стимулируя выработку специфических антител, не обладает токсичностью и реактогенностью для лабораторных животных [61]. Более того, иммунизация ОМВ возбудителя мелиоидоза давала защиту у мышей и нечеловекообразных приматов против аэрозольного заражения близкородственным патогеном *B. mallei* – возбудителем сапа [62]. В качестве вакцины против

B. mallei исследованы также ОМВ из аттенуированных штаммов другого близкородственного микроба – *B. thailandensis*. Полученный везикулярный препарат оказался наиболее перспективным даже по сравнению с везикулами *B. pseudomallei*. Он вызывал наибольший антительный ответ и обеспечивал полную протекцию мышей от аэрозольной инфекции [63].

Сибирская язва. Долгое время считалось, что способностью к продукции везикул обладают только грамотрицательные бактерии. Однако в последние годы появляется все больше работ, посвященных изучению внеклеточных образований у грамположительных бактерий. Они имеют в своей основе другой биогенез и строение, но выполняют аналогичные функции [10]. Так, экстрацеллюлярные везикулы (EV) возбудителя сибирской язвы (*Bacillus anthracis*) имеют двойную мембрану и диаметр от 50 до 150 нм [64]. Авторы установили, что эти образования могут включать компоненты токсина и антролизин. Более того, токсинсодержащие везикулы визуализированы и внутри макрофагов, инфицированных *B. anthracis*. Это может свидетельствовать в пользу их участия в патогенезе инфекционного процесса. На основе EV сибиреязвенного микроба предпринята попытка разработки везикулярной вакцины. Показано, что иммунизация мышей везикулярным препаратом эффективно индуцировала у них продукцию IgM и удлиняла среднюю продолжительность жизни после заражения *B. anthracis* Sterne strain [64].

Таким образом, одним из подходов к пониманию некоторых нерешенных проблем инфектологии может явиться изучение везикулярного аппарата патогенных бактерий и его роли в патогенезе инфекционных заболеваний. Это исследовательское направление, на наш взгляд, обладает большим научным потенциалом. Анализ данных литературы показывает, что везикулы обеспечивают бактериям условия, предохраняющие их от воздействия защитных механизмов хозяина. На примере многих бактерий показано, что процесс везикуляции является общебиологическим и интенсифицируется в макроорганизме. Нельзя исключить, что именно везикулы являются триггером развития инфекции, принимая на себя первый удар мощных факторов природного иммунитета хозяина. В частности, адсорбируя на себе нормальные иммуноглобулины сыворотки крови, ОМВ снижают бактерицидное действие мембраноатакующего комплекса сыворотки на живую микробную клетку и эффективность ее фагоцитоза. Модулируя иммунные реакции, везикулы могут подавлять цитокиновый ответ и определять беспрепятственную диссеминацию бактерий к тканям-мишеням. Как известно, возбудители особо опасных инфекций человека обладают выраженной цитокинингибирующей активностью, что позволяет им уклоняться от неспецифической защиты хозяина на первых этапах инфекции. На более поздних эта-

пах везикулы могут участвовать в развитии «цитокинетического хаоса». Запуск везикулами необратимого каскада патологических реакций, возможно, в некоторых случаях объясняет слабую эффективность этиотропной терапии даже при использовании антибактериальных препаратов, активных в отношении патогена.

Особое место в исследованиях везикул занимает оценка перспективности их использования в качестве вакцинных кандидатов. Уже имеются данные об успешном клиническом применении везикулярной вакцины против менингококков. Экспериментальные испытания на биологических моделях OMV-препаратов из различных бактерий, включая возбудителей ООИ, продемонстрировали их безопасность и выраженные протективные свойства. Таким образом, доказана целесообразность дальнейших исследований по созданию вакцин нового поколения на основе везикул наружных мембран.

В то же время многие вопросы о везикуляции у бактерий, особенно патогенных, остаются открытыми. В первую очередь это относится к композиционному составу и его влиянию на биологические свойства везикул. Например, при каких внешних условиях везикулы обогащены протективными антигенами или токсическими субстанциями. Недостаточно изучен вопрос о различиях в процессе везикуляции у вирулентных и авирулентных штаммов возбудителей инфекций человека. В настоящее время очевидно, что биология микробной клетки *in vitro* и *in vivo* существенно отличается. При этом установлено, что образование OMV наиболее интенсивно идет в организме хозяина, что создает определенные трудности в изучении феномена. В связи с этим поиск экспериментальных моделей, наиболее приближенных к макроорганизму, является актуальным, а исследование везикулярного аппарата патогенных бактерий – перспективным.

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

Список литературы

1. Rowe H.M., Huntley J.F. From the outside-in: The *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2015; 5:94. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00094.
2. Подладчиков О.Н. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; 3:33–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40.
3. Livorsi D.J., Stenehjem E., Stephens D.S. Virulence factors of gram-negative bacteria in sepsis with a focus on *Neisseria meningitidis*. *Contrib. Microbiol.* 2011; 17:31–47. DOI: 10.1159/000324008.
4. Knox K.W., Vesk M., Work E. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(4): 1206–17. DOI: 10.1128/JB.92.4.1206-1217.1966.
5. Chatterjee S.N., Das J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.* 1967; 49(1):1–11. DOI: 10.1099/00221287-49-1-1.
6. Beveridge T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 1999; 181(16):4725–33. DOI: 10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999.
7. Ellis T.N., Kuehn M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74(1):81–94. DOI: 10.1128/MMBR.00031-09.

8. Yoon H. Bacterial outer membrane vesicles as a delivery system for virulence regulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 26(8):1343–7. DOI: 10.4014/jmb.1604.04080.
9. Луста К.А., Кондашевская М.В. Участие внеклеточных мембранных нановезикул бактерий в патологических процессах. *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание.* 2019; 2. Публикация 3–5. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2019-2/3-5.pdf> (дата обращения 03.04.2019). DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16306.
10. Шендеров Б.А., Синица А.В., Захарченко М.М., Ткаченко Е.И. Внеклеточные везикулы (экзосомы) и их роль в биологии бактерий и реализации их патогенного потенциала. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2020; 7:118–30. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-118-130.
11. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64:163–84. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.
12. Tran F., Boedicker J.Q. Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer. *Sci. Rep.* 2017; 7(1):8813. DOI: 10.1038/s41598-017-07447-7.
13. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes. Dev.* 2005; 19(22):2645–55. DOI: 10.1101/gad.1299905.
14. Rueter C., Bielaszewska M. Secretion and delivery of intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence factors via outer membrane vesicles. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020; 10:91. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00091.
15. Lai C.H., Listgarten M.A., Hammond B.F. Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol. Res.* 1981; 16(4):379–89. DOI: 10.1111/j.1600-0765.1981.tb00989.x.
16. Wang S., Gao J., Wang Z. Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2019; 11(2):e1523. DOI: 10.1002/wnan.1523.
17. Pizzo M., Bekkat-Berkani R., Rappuoli R. Vaccines against meningococcal diseases. *Microorganisms.* 2020; 8(10):1521. DOI: 10.3390/microorganisms8101521.
18. Elluri S., Enow C., Vdovikova S., Rompikuntal P.K., Dongre M., Carlsson S., Pal A., Uhlin B.E., Wai S.N. Outer membrane vesicles mediate transport of biologically active *Vibrio cholerae* cytotoxin (VCC) from *V. cholerae* strains. *PLoS One.* 2014; 9(9):e106731. DOI: 10.1371/journal.pone.0106731.
19. Rasti E.S., Schappert M.L., Brown A.C. Association of *Vibrio cholerae* 569B outer membrane vesicles with host cells occurs in a GM1-independent manner. *Cell Microbiol.* 2018; 20(6):e12828. DOI: 10.1111/cmi.12828.
20. Rasti E.S., Brown A.C. Cholera toxin encapsulated within several *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba outer membrane vesicles lacks a functional B-subunit. *Toxins (Basel).* 2019; 11(4):207. DOI: 10.3390/toxins11040207.
21. Rompikuntal P.K., Vdovikova S., Duperthuy M., Johnson T.L., Åhlund M., Lundmark R., Oscarsson J., Sandkvist M., Uhlin B.E., Wai S.N. Outer membrane vesicle-mediated export of processed PrtV protease from *Vibrio cholerae*. *PLoS One.* 2015; 10(7):e0134098. DOI: 10.1371/journal.pone.0134098.
22. Mondal A., Tapader R., Chatterjee N.S., Ghosh A., Sinha R., Koley H., Saha D.R., Chakrabarti M.K., Wai S.N., Pal A. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2016; 84(5):1478–90. DOI: 10.1128/IAI.01365-15.
23. Bitar A., Aung K.M., Wai S.N., Hammarström M.-L. *Vibrio cholerae* derived outer membrane vesicles modulate the inflammatory response of human intestinal epithelial cells by inducing microRNA-146a. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):7212. DOI: 10.1038/s41598-019-43691-9.
24. Altindis E., Fu Y., Mekalanos J.J. Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014; 111(15):E1548–56. DOI: 10.1073/pnas.1403683111.
25. Sjöström A.E., Sandblad L., Uhlin B.E., Wai S.N. Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. *Sci. Rep.* 2015; 5:15329. DOI: 10.1038/srep15329.
26. Song T., Mika F., Lindmark B., Liu Z., Schild S., Bishop A., Zhu J., Camilli A., Johansson J., Vogel J., Wai S.N. A new *Vibrio cholerae* RNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* 2008; 70(1):100–11. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06392.x.
27. Zingl F.G., Kohl P., Cakar F., Leitner D.R., Mitterer F., Bonnington K.E., Rechberger G.N., Kuehn M.J., Guan Z., Reidl J., Schild S. Outer membrane vesiculation facilitates surface exchange and *in vivo* adaptation of *Vibrio cholerae*. *Cell Host Microbe.* 2020; 27(2):225–37.e8. DOI: 10.1016/j.chom.2019.12.002.
28. Fong J.N.C., Yildiz F.H. Biofilm matrix proteins. *Microbiol. Spectr.* 2015; 3(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014.
29. Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandström G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007; 60(1):33–9. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00254.x.

30. Valeru S.P., Shanan S., Alossimi H., Saeed A., Sandström G., Abd H. Lack of outer membrane protein a enhances the release of outer membrane vesicles and survival of *Vibrio cholerae* and suppresses viability of *Acanthamoeba castellanii*. *Int. J. Microbiol.* 2014; 2014:610190. DOI: 10.1155/2014/610190.
31. Reyes-Robles T., Dillard R.S., Cairns L.S., Silva-Valenzuela C.A., Housman M., Ali A., Wright E.R., Camilli A. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *J. Bacteriol.* 2018; 200(15):e00792-17. DOI: 10.1128/JB.00792-17.
32. Adriani R., Mousavi Gargari S.L., Nazarian S., Sarvary S., Noroozi N. Immunogenicity of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles secreted at various environmental conditions. *Vaccine.* 2018; 36(2):322–30. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.004.
33. Sedaghat M., Siadat S.D., Mirabzadeh E., Keramati M., Vaziri F., Shafiei M., Shahcheraghi F. Evaluation of antibody responses to outer membrane vesicles (OMVs) and killed whole cell of *Vibrio cholerae* O1 El Tor in immunized mice. *Iran J. Microbiol.* 2019; 11(3):212–9.
34. Wang Z., Lazinski D.W., Camilli A. Immunity provided by an outer membrane vesicle cholera vaccine is due to O-antigen-specific antibodies inhibiting bacterial motility. *Infect. Immun.* 2016; 85(1):e00626–16. DOI: 10.1128/IAI.00626-16.
35. Sinha R., Howlader D.R., Ta A., Mitra S., Das S., Koley H. Retinoic acid pre-treatment down regulates *V. cholerae* outer membrane vesicles induced acute inflammation and enhances mucosal immunity. *Vaccine.* 2017; 35(28):3534–47. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.036.
36. Kolodziejek A.M., Caplan A.B., Bohach G.A., Paszczynski A.J., Minnich S.A., Hovde C.J. Physiological levels of glucose induce membrane vesicle secretion and affect the lipid and protein composition of *Yersinia pestis* cell surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(14):4509–14. DOI: 10.1128/AEM.00675-13.
37. Eddy J.L., Gielda L.M., Caulfield A.J., Rangel S.M., Latham W.W. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS One.* 2014; 9(9):e107002. DOI: 10.1371/journal.pone.0107002.
38. Дудина Л.Г., Малкова М.А., Чернядьев А.В., Литвинцев С.Г., Бывалов А.А. Влияние специфических бактериофагов и гентамицина на морфологию и везикулообразование бактерий *Yersinia pestis* EV. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 2:50–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-50-54.
39. Carvalho A.L., Miquel-Clopés A., Wegmann U., Jones E., Stentz R., Telatin A., Walker N.J., Butcher W.A., Brown P.J., Holmes S., Dennis M.J., Williamson E.D., Funnell S.G.P., Stock M., Carding S.R. Use of bioengineered human commensal gut bacteria-derived microvesicles for mucosal plague vaccine delivery and immunization. *Clin. Exp. Immunol.* 2019; 196(3):287–304. DOI: 10.1111/cei.13301.
40. Wang X., Singh A.K., Zhang X., Sun W. Induction of protective antiplague immune responses by self-adjuncting bionanoparticles derived from engineered *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* 2020; 88(5):e00081-20. DOI: 10.1128/IAI.00081-20.
41. Олсуфьев Н.Г., Руднев Г.П., редакторы. Туляремия. М.: Медгиз; 1960. 460 с.
42. Pierson T., Matrakas D., Taylor Y.U., Manyam G., Morozov V.N., Zhou W., van Hoek M.L. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J. Proteome Res.* 2011; 10(3):954–67. DOI: 10.1021/pr1009756.
43. McCaig W.D., Koller A., Thanassi D.G. Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *J. Bacteriol.* 2013; 195(6):1120–32. DOI: 10.1128/JB.02007-12.
44. Champion A.E., Bandara A.B., Mohapatra N., Fulton K.M., Twine S.M., Inzana T.J. Further characterization of the capsule-like complex (CLC) produced by *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*: protective efficacy and similarity to outer membrane vesicles. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2018; 8:182. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00182.
45. Sampath V., McCaig W.D., Thanassi D.G. Amino acid deprivation and central carbon metabolism regulate the production of outer membrane vesicles and tubes by *Francisella*. *Mol. Microbiol.* 2018; 107(4):523–41. DOI: 10.1111/mmi.13897.
46. Siebert C., Lindgren H., Ferré S., Villers C., Boisset S., Perard J., Sjöstedt A., Maurin M., Brochier-Armanet C., Couté Y., Renesto P. *Francisella tularensis*: FupA mutation contributes to fluoroquinolone resistance by increasing vesicle secretion and biofilm formation. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8(1):808–22. DOI: 10.1080/22221751.2019.1615848.
47. Chen F., Cui G., Wang S., Nair M.K. M., He L., Qi X., Han X., Zhang H., Zhang J.-R., Su J. Outer membrane vesicle-associated lipase FtlA enhances cellular invasion and virulence in *Francisella tularensis* LVS. *Emerg. Microbes Infect.* 2017; 6(7):c66. DOI: 10.1038/emi.2017.53.
48. Klimentova J., Pavkova I., Horcickova L., Bavlovic J., Kofronova O., Benada O., Stulik J. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* releases differentially loaded outer membrane vesicles under various stress conditions. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2304. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02304.
49. Chen L., Valentine J.L., Huang C.J., Endicott C.E., Moeller T.D., Rasmussen J.A., Fletcher J.R., Boll J.M., Rosenthal J.A., Dobruchowska J., Wang Z., Heiss C., Azadi P., Putnam D., Trent M.S., Jones B.D., DeLisa M.P. Outer membrane vesicles displaying engineered glycotopes elicit protective antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016; 113(26):E3609-18. DOI: 10.1073/pnas.1518311113.
50. Gamazo C., Moriyon I. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect. Immun.* 1987; 55(3):609–15. DOI: 10.1128/IAI.55.3.609-615.1987.
51. Pollak C.N., Delpino M.V., Fossati C.A., Baldi P.C. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. *PLoS One.* 2012; 7(11):e50214. DOI: 10.1371/journal.pone.0050214.
52. Zavattieri L., Ferrero M.C., Alonso Paiva I.M., Sotelo A.D., Casellada A.M., Baldi P.C. *Brucella abortus* proliferates in decidualized and non-decidualized human endometrial cells inducing a proinflammatory response. *Pathogens.* 2020; 9(5):369. DOI: 10.3390/pathogens9050369.
53. Avila-Calderón E.D., Lopez-Merino A., Jain N., Peralta H., López-Villegas E.O., Sriranganathan N., Boyle S.M., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012:352493. DOI: 10.1155/2012/352493.
54. Avila-Calderón E.D., Medina-Chávez O., Flores-Romo L., Hernández-Hernández J.M., Donis-Maturano L., López-Merino A., Arellano-Reynoso B., Aguilera-Arreola M.G., Ruiz E.A., Gomez-Lunar Z., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* modulate immune response and induce cytoskeleton rearrangement in peripheral blood mononuclear cells. *Front. Microbiol.* 2020; 11:556795. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556795.
55. Kaur G., Singh S., Sunil Kumar B.V., Mahajan K., Verma R. Characterization and immunogenicity of outer membrane vesicles from *Brucella abortus*. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37(3):261–72. DOI: 10.1080/15321819.2015.1132231.
56. Bagheri Nejad R., Yahyaeyat R., Es-Haghi A., Nayeri Fasayi B., Zahraei Salehi T. Induction of specific cell-mediated immune responses and protection in BALB/c mice by vaccination with outer membrane vesicles from a *Brucella melitensis* human isolate. *APMIS.* 2019; 127(12):797–804. DOI: 10.1111/apm.12997.
57. Golshani M., Amani M., Amirzadeh F., Nazeri E., Davar Siadat S., Nejati-Moheimani M., Arsang A., Bouzari S. Evaluation of Poly(I:C) and combination of CpG ODN plus Montanide ISA adjuvants to enhance the efficacy of outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Brucella melitensis* infection in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2020; 84:106573. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106573.
58. Nieves W., Heang J., Asakrah S., Höner zu Bentrop K., Roy C.J., Morici L.A. Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization. *PLoS One.* 2010; 5(12):e14361. DOI: 10.1371/journal.pone.0014361.
59. Nieves W., Asakrah S., Qazi O., Brown K.A., Kurtz J., Aucoin D.P., McLachlan J.B., Roy C.J., Morici L.A. A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary *Burkholderia pseudomallei* infection. *Vaccine.* 2011; 29(46):8381–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.058.
60. Nieves W., Petersen H., Judy B.M., Blumentritt C.A., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Torres A.G., Morici L.A. A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides protection against lethal sepsis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014; 21(5):747–54. DOI: 10.1128/CI.00119-14.
61. Petersen H., Nieves W., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Morici L.A. Evaluation of a *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine in nonhuman primates. *Procedia Vaccinol.* 2014; 8:38–42. DOI: 10.1016/j.provac.2014.07.007.
62. Baker S.M., Davitt C.J.H., Motyka N., Kikendall N.L., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Morici L.A. A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides cross protection against inhalational glanders in mice and non-human primates. *Vaccines (Basel).* 2017; 5(4):49. DOI: 10.3390/vaccines5040049.
63. Norris M.H., Khan M.S.R., Chirakul S., Schweizer H.P., Tuanyok A. Outer membrane vesicle vaccines from biosafe surrogates prevent acute lethal glanders in mice. *Vaccines (Basel).* 2018; 6(1):5. DOI: 10.3390/vaccines6010005.
64. Rivera J., Cordero R.J., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010; 107(44):19002–7. DOI: 10.1073/pnas.1008843107.

References

1. Rowe H.M., Huntley J.F. From the outside-in: The *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2015; 5:94. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00094.
2. Podladchikova O.N. [Modern views on molecular mechanisms of plague pathogenesis]. *Problemy Osobo Opasnykh*

- Infeksii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (3):33–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40.
3. Livorsi D.J., Stenehjem E., Stephens D.S. Virulence factors of gram-negative bacteria in sepsis with a focus on *Neisseria meningitidis*. *Contrib. Microbiol.* 2011; 17:31–47. DOI: 10.1159/000324008.
 4. Knox K.W., Vesk M., Work E. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(4): 1206–17. DOI: 10.1128/JB.92.4.1206-1217.1966.
 5. Chatterjee S.N., Das J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.* 1967; 49(1):1–11. DOI: 10.1099/00221287-49-1-1.
 6. Beveridge T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 1999; 181(16):4725–33. DOI: 10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999.
 7. Ellis T.N., Kuehn M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74(1):81–94. DOI: 10.1128/MMBR.00031-09.
 8. Yoon H. Bacterial outer membrane vesicles as a delivery system for virulence regulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 26(8):1343–7. DOI: 10.4014/jmb.1604.04080.
 9. Lusta K.A., Kondashevskaya M.V. [Participation of extracellular membrane nanovesicles of bacteria in pathological processes]. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologii. [Bulletin of New Medical Technologies]*. Electronic edition. 2019; 2. Publication 3–5. (Cited 03 Apr 2019). [Internet]. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2019-2/3-5.pdf>. DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16306.
 10. Shenderov B.A., Sinitsa A.V., Zakharchenko M.M., Tkachenko E.I. [Extracellular vesicles (exosomes) and their role in bacterial biology and the realization of their pathogenic potential]. *Eksperimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya [Experimental and Clinical Gastroenterology]*. 2020; 7:118–30. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-118-130.
 11. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64:163–84. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.
 12. Tran F., Boedicker J.Q. Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer. *Sci. Rep.* 2017; 7(1):8813. DOI: 10.1038/s41598-017-07447-7.
 13. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes. Dev.* 2005; 19(22):2645–55. DOI: 10.1101/gad.1299905.
 14. Rueter C., Bielaszewska M. Secretion and delivery of intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence factors via outer membrane vesicles. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020; 10:91. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00091.
 15. Lai C.H., Listgarten M.A., Hammond B.F. Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycescomitans*. *J. Periodontol. Res.* 1981; 16(4):379–89. DOI: 10.1111/j.1600-0765.1981.tb00989.x.
 16. Wang S., Gao J., Wang Z. Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2019; 11(2):e1523. DOI: 10.1002/wnan.1523.
 17. Pizza M., Bekkat-Berkani R., Rappuoli R. Vaccines against meningococcal diseases. *Microorganisms*. 2020; 8(10):1521. DOI: 10.3390/microorganisms8101521.
 18. Elluri S., Enow C., Vdovikova S., Rompikuntal P.K., Dongre M., Carlsson S., Pal A., Uhlin B.E., Wai S.N. Outer membrane vesicles mediate transport of biologically active *Vibrio cholerae* cytotoxin (VCC) from *V. cholerae* strains. *PLoS One*. 2014; 9(9):e106731. DOI: 10.1371/journal.pone.0106731.
 19. Rasti E.S., Schappert M.L., Brown A.C. Association of *Vibrio cholerae* 569B outer membrane vesicles with host cells occurs in a GM1-independent manner. *Cell Microbiol.* 2018; 20(6):e12828. DOI: 10.1111/cmi.12828.
 20. Rasti E.S., Brown A.C. Cholera toxin encapsulated within several *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba outer membrane vesicles lacks a functional B-subunit. *Toxins (Basel)*. 2019; 11(4):207. DOI: 10.3390/toxins11040207.
 21. Rompikuntal P.K., Vdovikova S., Duperthuy M., Johnson T.L., Ahlund M., Lundmark R., Oscarsson J., Sandkvist M., Uhlin B.E., Wai S.N. Outer membrane vesicle-mediated export of processed PrtV protease from *Vibrio cholerae*. *PLoS One*. 2015; 10(7):e0134098. DOI: 10.1371/journal.pone.0134098.
 22. Mondal A., Tapader R., Chatterjee N.S., Ghosh A., Sinha R., Koley H., Saha D.R., Chakrabarti M.K., Wai S.N., Pal A. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2016; 84(5):1478–90. DOI: 10.1128/IAI.01365-15.
 23. Bitar A., Aung K.M., Wai S.N., Hammarström M.-L. *Vibrio cholerae* derived outer membrane vesicles modulate the inflammatory response of human intestinal epithelial cells by inducing microRNA-146a. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):7212. DOI: 10.1038/s41598-019-43691-9.
 24. Altindis E., Fu Y., Mekalanos J.J. Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2014; 111(15):E1548–56. DOI: 10.1073/pnas.1403683111.
 25. Sjöström A.E., Sandblad L., Uhlin B.E., Wai S.N. Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. *Sci. Rep.* 2015; 5:15329. DOI: 10.1038/srep15329.
 26. Song T., Mika F., Lindmark B., Liu Z., Schild S., Bishop A., Zhu J., Camilli A., Johansson J., Vogel J., Wai S.N. A new *Vibrio cholerae* RNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* 2008; 70(1):100–11. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06392.x.
 27. Zingl F.G., Kohl P., Cakar F., Leitner D.R., Mitterer F., Bonnington K.E., Rechberger G.N., Kuehn M.J., Guan Z., Reidl J., Schild S. Outer membrane vesiculation facilitates surface exchange and *in vivo* adaptation of *Vibrio cholerae*. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(2):225–37.e8. DOI: 10.1016/j.chom.2019.12.002.
 28. Fong J.N.C., Yildiz F.H. Biofilm matrix proteins. *Microbiol. Spectr.* 2015; 3(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014.
 29. Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandström G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007; 60(1):33–9. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00254.x.
 30. Valeru S.P., Shanan S., Alossimi H., Saeed A., Sandström G., Abd H. Lack of outer membrane protein a enhances the release of outer membrane vesicles and survival of *Vibrio cholerae* and suppresses viability of *Acanthamoeba castellanii*. *Int. J. Microbiol.* 2014; 2014:610190. DOI: 10.1155/2014/610190.
 31. Reyes-Robles T., Dillard R.S., Cairns L.S., Silva-Valenzuela C.A., Housman M., Ali A., Wright E.R., Camilli A. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *J. Bacteriol.* 2018; 200(15):e00792-17. DOI: 10.1128/JB.00792-17.
 32. Adriani R., Mousavi Gargari S.L., Nazarian S., Sarvary S., Noroozi N. Immunogenicity of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles secreted at various environmental conditions. *Vaccine*. 2018; 36(2):322–30. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.004.
 33. Sedaghat M., Siadat S.D., Mirabzadeh E., Keramati M., Vaziri F., Shafiei M., Shahcheraghi F. Evaluation of antibody responses to outer membrane vesicles (OMVs) and killed whole cell of *Vibrio cholerae* O1 El Tor in immunized mice. *Iran J. Microbiol.* 2019; 11(3):212–9.
 34. Wang Z., Lazinski D.W., Camilli A. Immunity provided by an outer membrane vesicle cholera vaccine is due to O-antigen-specific antibodies inhibiting bacterial motility. *Infect. Immun.* 2016; 85(1):e00626–16. DOI: 10.1128/IAI.00626-16.
 35. Sinha R., Howlader D.R., Ta A., Mitra S., Das S., Koley H. Retinoic acid pre-treatment down regulates *V. cholerae* outer membrane vesicles induced acute inflammation and enhances mucosal immunity. *Vaccine*. 2017; 35(28):3534–47. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.036.
 36. Kolodziejek A.M., Caplan A.B., Bohach G.A., Paszczynski A.J., Minnich S.A., Hovde C.J. Physiological levels of glucose induce membrane vesicle secretion and affect the lipid and protein composition of *Yersinia pestis* cell surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(14):4509–14. DOI: 10.1128/AEM.00675-13.
 37. Eddy J.L., Gielda L.M., Caulfield A.J., Rangel S.M., Latham W.W. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS One*. 2014; 9(9):e107002. DOI: 10.1371/journal.pone.0107002.
 38. Dudina L.G., Malkova M.A., Chernyad'ev A.V., Litvinets S.G., Byvalov A.A. [Effect of bacteriophages and gentamycin on morphology and vesicle formation of bacteria]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (2):50–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-50-54.
 39. Carvalho A.L., Miquel-Clopès A., Wegmann U., Jones E., Stentz R., Telatin A., Walker N.J., Butcher W.A., Brown P.J., Holmes S., Dennis M.J., Williamson E.D., Funnell S.G.P., Stock M., Carding S.R. Use of bioengineered human commensal gut bacteria-derived microvesicles for mucosal plague vaccine delivery and immunization. *Clin. Exp. Immunol.* 2019; 196(3):287–304. DOI: 10.1111/cei.13301.
 40. Wang X., Singh A.K., Zhang X., Sun W. Induction of protective antiplague immune responses by self-adjuncting bionanoparticles derived from engineered *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 2020; 88(5):e00081-20. DOI: 10.1128/IAI.00081-20.
 41. Olsuf'ev N.G., Rudnev G.P., editors. [Tularemia]. Moscow: "Medgiz"; 1960. 460 p.
 42. Pierson T., Matrakas D., Taylor Y.U., Manyam G., Morozov V.N., Zhou W., van Hoek M.L. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J. Proteome Res.* 2011; 10(3):954–67. DOI: 10.1021/pr1009756.
 43. McCaig W.D., Koller A., Thanassi D.G. Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *J. Bacteriol.* 2013; 195(6):1120–32. DOI: 10.1128/JB.02007-12.
 44. Champion A.E., Bandara A.B., Mohapatra N., Fulton K.M., Twine S.M., Inzana T.J. Further characterization of the capsule-like complex (CLC) produced by *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*: protective efficacy and similarity to outer membrane vesicles. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2018; 8:182. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00182.

45. Sampath V., McCaig W.D., Thanassi D.G. Amino acid deprivation and central carbon metabolism regulate the production of outer membrane vesicles and tubes by *Francisella*. *Mol. Microbiol.* 2018; 107(4):523–41. DOI: 10.1111/mmi.13897.
46. Siebert C., Lindgren H., Ferré S., Villers C., Boisset S., Perard J., Sjöstedt A., Maurin M., Brochier-Armanet C., Couté Y., Renesto P. *Francisella tularensis*: FupA mutation contributes to fluoroquinolone resistance by increasing vesicle secretion and biofilm formation. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8(1):808–22. DOI: 10.1080/22221751.2019.1615848.
47. Chen F., Cui G., Wang S., Nair M.K. M., He L., Qi X., Han X., Zhang H., Zhang J.-R., Su J. Outer membrane vesicle-associated lipase FtlA enhances cellular invasion and virulence in *Francisella tularensis* LVS. *Emerg. Microbes Infect.* 2017; 6(7):c66. DOI: 10.1038/emi.2017.53.
48. Klimentova J., Pavkova I., Horcickova L., Bavlovic J., Kofronova O., Benada O., Stulik J. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* releases differentially loaded outer membrane vesicles under various stress conditions. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2304. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02304.
49. Chen L., Valentine J.L., Huang C.J., Endicott C.E., Moeller T.D., Rasmussen J.A., Fletcher J.R., Boll J.M., Rosenthal J.A., Dobruchowska J., Wang Z., Heiss C., Azadi P., Putnam D., Trent M.S., Jones B.D., DeLisa M.P. Outer membrane vesicles displaying engineered glycotopes elicit protective antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016; 113(26):E3609–18. DOI: 10.1073/pnas.1518311113.
50. Gamazo C., Moriyon I. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect. Immun.* 1987; 55(3):609–15. DOI: 10.1128/IAI.55.3.609-615.1987.
51. Pollak C.N., Delpino M.V., Fossati C.A., Baldi P.C. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. *PLoS One.* 2012; 7(11):e50214. DOI: 10.1371/journal.pone.0050214.
52. Zavattieri L., Ferrero M.C., Alonso Paiva I.M., Sotelo A.D., Canellada A.M., Baldi P.C. *Brucella abortus* proliferates in decidualized and non-decidualized human endometrial cells inducing a proinflammatory response. *Pathogens.* 2020; 9(5):369. DOI: 10.3390/pathogens9050369.
53. Avila-Calderón E.D., Lopez-Merino A., Jain N., Peralta H., López-Villegas E.O., Sriranganathan N., Boyle S.M., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012:352493. DOI: 10.1155/2012/352493.
54. Avila-Calderón E.D., Medina-Chávez O., Flores-Romo L., Hernández-Hernández J.M., Donis-Maturano L., López-Merino A., Arellano-Reynoso B., Aguilera-Arreola M.G., Ruiz E.A., Gomez-Lunar Z., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* modulate immune response and induce cytoskeleton rearrangement in peripheral blood mononuclear cells. *Front. Microbiol.* 2020; 11:556795. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556795.
55. Kaur G., Singh S., Sunil Kumar B.V., Mahajan K., Verma R. Characterization and immunogenicity of outer membrane vesicles from *Brucella abortus*. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37(3):261–72. DOI: 10.1080/15321819.2015.1132231.
56. Bagheri Nejad R., Yahyaeyat R., Es-Haghi A., Nayeri Fasayi B., Zahraei Salehi T. Induction of specific cell-mediated immune responses and protection in BALB/c mice by vaccination with outer membrane vesicles from a *Brucella melitensis* human isolate. *APMIS.* 2019; 127(12):797–804. DOI: 10.1111/apm.12997.
57. Golshani M., Amani M., Amirzadeh F., Nazeri E., Davar Siadat S., Nejati-Moheimani M., Arsang A., Bouzari S. Evaluation of Poly(I:C) and combination of CpG ODN plus Montanide ISA adjuvants to enhance the efficacy of outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Brucella melitensis* infection in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2020; 84:106573. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106573.
58. Nieves W., Heang J., Asakrah S., Höner zu Bentrop K., Roy C.J., Morici L.A. Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization. *PLoS One.* 2010; 5(12):e14361. DOI: 10.1371/journal.pone.0014361.
59. Nieves W., Asakrah S., Qazi O., Brown K.A., Kurtz J., Aucoin D.P., McLachlan J.B., Roy C.J., Morici L.A. A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary *Burkholderia pseudomallei* infection. *Vaccine.* 2011; 29(46):8381–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.058.
60. Nieves W., Petersen H., Judy B.M., Blumentritt C.A., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Torres A.G., Morici L.A. A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides protection against lethal sepsis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014; 21(5):747–54. DOI: 10.1128/CVI.00119-14.
61. Petersen H., Nieves W., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Morici L.A. Evaluation of a *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine in nonhuman primates. *Proceedia Vaccinol.* 2014; 8:38–42. DOI: 10.1016/j.provac.2014.07.007.
62. Baker S.M., Davitt C.J.H., Motyka N., Kikendall N.L., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Morici L.A. A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides cross protection against inhalational glanders in mice and non-human primates. *Vaccines (Basel).* 2017; 5(4):49. DOI: 10.3390/vaccines5040049.
63. Norris M.H., Khan M.S.R., Chirakul S., Schweizer H.P., Tuanyok A. Outer membrane vesicle vaccines from biosafe surrogates prevent acute lethal glanders in mice. *Vaccines (Basel).* 2018; 6(1):5. DOI: 10.3390/vaccines6010005.
64. Rivera J., Cordero R.J., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010; 107(44):19002–7. DOI: 10.1073/pnas.1008843107.

Authors:

Aronova N.V., Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V., Anisimova A.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.
Golovin S.N. Don State Technical University. 1, Gagarin square, Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation.

Об авторах:

Аронова Н.В., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Анисимова А.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.
Головин С.Н. Донской государственный технический университет. Российская Федерация, 344000, Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, 1.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-16-26

УДК 616-036.22(470)

А.В. Иванова¹, С.К. Удовиченко², А.Е. Шиянова³, Л.Н. Дмитриева¹, М.В. Поспелов¹,
Ж.А. Касьян¹, А.А. Зимирова¹

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ, ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ САНИТАРНОЙ ОХРАНЫ ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, В ЕВРОПЕЙСКОМ РЕГИОНЕ ВОЗ

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

²ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация;

³ФКУЗ «Противочумный центр», Москва, Российская Федерация

В обзоре представлены обобщенные эпидемиологические данные и проанализирована ситуация в странах Европейского региона Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по инфекционным болезням, требующим проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации. Эпидемиологический анализ проведен по данным официальных сайтов и периодических изданий ВОЗ, Европейского бюро ВОЗ, министерств здравоохранения стран, Европейского центра профилактики и контроля заболеваний, других международных организаций, а также материалам публикаций в открытом доступе. В работе обобщены и систематизированы данные по заболеваемости и территориальному распространению болезней в каждой конкретной стране с позиции возможных рисков для посещающих ее лиц. Представленные данные по инфекционным болезням позволяют ориентироваться в вопросах, связанных с риском заражения инфекционными болезнями, определить факторы и сезонность повышенного риска заражения, прогнозировать возможность завоза болезней в Российскую Федерацию.

Ключевые слова: особо опасные инфекционные болезни, Европейский регион ВОЗ, обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия.

Корреспондирующий автор: Иванова Александра Васильевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Иванова А.В., Удовиченко С.К., Шиянова А.Е., Дмитриева Л.Н., Поспелов М.В., Касьян Ж.А., Зимирова А.А. Распространение инфекционных болезней, значимых для санитарной охраны территории Российской Федерации, в Европейском регионе ВОЗ. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:16–26. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-16-26

Поступила 02.08.2021. Принята к публ. 13.08.2021.

A.V. Ivanova¹, S.K. Udovichenko², A.E. Shiyanova³, L.N. Dmitrieva¹, M.V. Pospelov¹, Zh.A. Kas'yan¹,
A.A. Zimirova¹

Distribution of Infectious Diseases Significant for Sanitary Protection of the Territory of the Russian Federation in the WHO European Region

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

²Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation;

³Plague Control Center, Moscow, Russian Federation

Abstract. The review presents generalized epidemiological data and the situation on infectious diseases requiring measures for the sanitary protection of the territory of the Russian Federation in the countries of the European Region of the World Health Organization (WHO). The epidemiological analysis was carried out using data from the official websites and periodicals of WHO, the WHO European Office, the ministries of health of countries, the European Center for Disease Prevention and Control, other international organizations, as well as materials from publicly available publications. The review summarizes and systematizes data on the incidence and territorial distribution of diseases in each specific country from the standpoint of possible risks for people visiting it. The presented data on infectious diseases make it possible to navigate through issues related to the risk of contracting infectious diseases, to determine the factors and seasonality of an increased risk of infection, and to predict the possibility of importing diseases into the Russian Federation.

Key words: particularly dangerous infectious diseases, the WHO European Region, sanitary-epidemiological welfare provision.

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

Corresponding author: Alexandra V. Ivanova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Ivanova A.V., Udovichenko S.K., Shiyanova A.E., Dmitrieva L.N., Pospelov M.V., Kas'yan Zh.A., Zimirova A.A. Distribution of Infectious Diseases Significant for Sanitary Protection of the Territory of the Russian Federation in the WHO European Region. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:16–26. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-16-26

Received 02.08.2021. Accepted 13.08.2021.

Ivanova A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4849-3866>

Udovichenko S.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8682-1536>

Глобализация международной торговли, развитие высокоскоростных транспортных сообщений, рост миграционных потоков, интенсификация

антропогенного воздействия на среду обитания определили высокую уязвимость международного сообщества перед лицом угроз и вызовов санитарно-

эпидемиологического (биологического) характера, которые перестали носить гипотетический характер [1–3]. О масштабах последствий их реализации в современный период можно судить исходя из распространения новой коронавирусной инфекции – COVID-19, которая по числу охваченных ей стран (более 220) и количеству больных (свыше 183 млн на 01.07.2021, из них более 3,9 млн летальных случаев) многократно превзошла все известные человечеству пандемии за последние сто лет [4]. В этих условиях особую актуальность приобретает укрепление на национальном и международном уровнях систем раннего выявления, предупреждения и максимально точного прогнозирования потенциальных эпидемических событий до перерастания их в чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения международного значения.

Учитывая вышеизложенное, нами инициирована работа по заблаговременной инвентаризации, систематизации и объективному мониторингованию эпидемиологических угроз (актуальных, новых, возвращающихся, распространяющихся на новые территории) в различных регионах и странах мира [5]. Предметом настоящего обзора является обобщение результатов ретроспективной оценки и оперативного информационно-аналитического анализа инфекционной заболеваемости в Европейском регионе Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), объединяющем 53 страны континентальной Европы, Западной и Центральной Азии. Первоочередность мониторинга эпидемиологических рисков в данном регионе определяется наличием множества факторов, способствующих интродукции (заносу) инфекционных болезней с указанных территорий в Российскую Федерацию: общностью границ с 11 странами Европы, созданием в рамках международных соглашений единых экономических пространств, высокой миграционной активностью населения, наличием трансграничных природных очагов инфекционных болезней, включая особо опасные.

Ретроспективный анализ инфекционной заболеваемости проводили на основании данных официальных сайтов и периодических изданий ВОЗ, Европейского бюро ВОЗ, Европейского центра профилактики и контроля заболеваний (ECDC), министерств здравоохранения соответствующих стран. При подготовке обзора эпидемиологической обстановки также использованы данные, полученные с сайтов других международных организаций (Всемирная организация по охране здоровья животных), Глобальной сети по инфекционным болезням и эпидемиологии (Global Infectious Disease & Epidemiology Network – GIDEON), ProMED-mail, национальных информационных агентств, из монографических и справочных изданий, опубликованных научных статей и интернет-ресурсов. При расчете интенсивных показателей заболеваемости (табл. 1) использованы оценочные данные Департамента по экономическим и социальным вопросам Организации

Объединенных Наций (Отдел народонаселения) по численности населения в странах Европейского региона в 1990–2020 гг. [6].

Данные по заболеваемости и эндемичности на территории стран Европейского региона ВОЗ схематично обобщены в табл. 1.

Далее представлена более подробная информация о нозологических формах, характеризующихся высокой социально-экономической значимостью и требующих привлечения большого объема ресурсов для повышения эффективности их контроля.

Чума. В Европейском регионе ВОЗ природные очаги чумы расположены на территориях 11 стран: Азербайджан, Армения, Грузия, Казахстан, Киргизия, Россия, Таджикистан, Туркменистан, Узбекистан, Турция и Израиль. Общая площадь очаговых по чуме территорий составляет более 2 млн км². Большинство природных очагов чумы региона являются трансграничными, а их эпизоотическая активность и эпидемическая значимость существенно отличаются в зависимости от основного носителя и подвида, циркулирующего в очаге возбудителя чумы. Анализ многолетних данных по эпизоотической ситуации в природных очагах ряда государств показывает существование постоянных энзоотических процессов с периодической активностью в зависимости от природно-климатических и эпизоотических факторов. Наиболее активные природные очаги чумы в Европейском регионе ВОЗ располагаются на территориях Республики Казахстан и Российской Федерации.

Случаи заболевания людей чумой в разное время отмечены во всех энзоотичных странах региона. Эпидемические проявления чумы на территории Армении регистрировались в 1958, 1969 и 1975 гг. – три случая бубонной чумы [7]. За период с 1975 по 2003 год в Казахстане зарегистрировано 33 случая заболеваний чумой людей, из которых 21 закончился летальным исходом (летальность – 63,6 %). Последние четыре случая чумы в стране отмечены в 2003 г. на западе Казахстана [8]. В 2013 г. зарегистрирован один случай заболевания бубонной чумой (летальный) в урочище Оттук Ак-Суйского района Иссык-Кульской области Киргизии. Ранее sporadические случаи заболевания бубонной чумой в республике отмечались в 1965 и 1982 гг. [9]. Единственная вспышка чумы в Таджикистане произошла в 1898 г., когда в кишлаке Анзоб заболел 221 человек [9]. Последняя вспышка чумы в Узбекистане произошла в августе 1999 г. в урочище Лахалы Казалинского района. Всего заболело 12 человек, участвовавших в прирезке больного верблюда. Предыдущая вспышка в республике, связанная с чумным верблюдом, зарегистрирована в 1948 г. [7]. Эпидемические проявления чумы в Туркменистане зарегистрированы в 1912 г., 1953 г. (54 случая заболевания), 1954 г. (1 случай) и 1968 г. (2 случая). Последний случай в Азербайджане отмечен в 1970 г. Впервые эпидемии чумы на территории Грузии опи-

Таблица 1 / Table 1

Эндемичность территории по актуальным инфекционным болезням и среднелетние показатели заболеваемости на 100 тыс. населения в странах Европейского региона ВОЗ за период 1990–2020 гг.

Endemicity of the territory for relevant infectious diseases and average long-term annual incidence rates per 100 thousand population in the countries of the WHO European Region for the period of 1990–2020

Страна Country	Чума Plague		Холера Cholera		Малярия Malaria		Лихорадка денге Dengue fever		КГЛ Crimean hemorrhagic fever		Лихорадка Западного Нила West Nile fever		Сибирская язва Anthrax		Бруцеллез Brucellosis		Туляремия Tularemia	
	ИП / П	N	ИП / П	N	ИП / П	N	ИП / П	N	ИП / П	N	ИП / П	N	ИП / П	N	ИП / П	N	ИП / П	N
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Австрия / Austria			0,01	3	0,64	11	0,6	10							0,04	12	0,05	10
Азербайджан / Azerbaijan					16,3	29							0,2	30	5,51	30		
Албания / Albania					0,03	4			0,08	6			0,6	11	19,4	12		
Армения / Armenia					6,3	21							0,13	12	7,75	26		
Беларусь / Belarus			0,03	2	0,1	15							0,03	1	0,01	6	0,02	10
Бельгия / Belgium			0,01	10	3,4	29							0,001	1	0,03	25		
Болгария / Bulgaria					0,25	29			0,12	30	0,06	6	0,06	26	0,08	23		
Босния и Герцеговина / Bosnia and Herzegovina					0,07	2							0,004	2	5,5	15	0,01	5
Великобритания / Great Britain			0,01	13	2,35	11	0,4	11	0,001	2			0,001	2	0,03	13	0,001	3
Венгрия / Hungary					0,08	22					0,4	11	0,04	3	0,01	7		
Германия / Germany			0,001	9	1,02	8	0,7	12	0,002	1			0,003	1	0,013	13	0,02	12
Греция / Greece					0,09	10	0,01	8	0,01	1	1,06	9	0,04	19	2,05	30		
Грузия / Georgia					1,7	27							1,01	25	3,9	29		
Дания / Denmark			0,01	5	1,62	6											0,02	9
Израиль / Israel			0,002	3	1,01	26	0,12	10			1,22	21			3,22	31		
Ирландия / Ireland					1,6	11	0,2	8							0,006	9		
Исландия / Iceland					0,87	7												
Испания / Spain			0,003	17	0,002	7	0,006	2			0,01	4	0,07	21	2,4	30		
Италия / Italy			0,001	9	0,001	12	0,05	13			0,06	13	0,001	9	1,15	30		
Казахстан / Kazakhstan	0,01	8											0,05	18	13,57	26		
Кипр / Cyprus					0,13	7					0,4	3			0,06	7		
Киргизия / Kyrgyzstan					3,7	15							0,31	15	40,4	15		
Латвия / Latvia					0,19	30	0,3	11										
Литва / Lithuania					0,3	26	0,11	7										

Окончание табл. 1 / Ending of the Table 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Македония / Macedonia					0,08	5							0,04	4	12,6	13	0,1	3
Мальта / Malta					0,7	23	0,01	6										
Молдова / Moldova			0,02	2									0,04	8				
Нидерланды / Netherlands			0,002	15	1,4	13									0,02	13		
Норвегия / Norway					1,2	31	1,07	9							0,03	21	0,64	29
Польша / Poland			0,01	1	0,06	12	0,04	12					0,001	4	0,01	9	0,02	11
Португалия / Portugal					0,79	30	0,13	5					0,01	11	3,8	28		
Россия / Russian Federation	0,0001	3							0,07	14	0,1	14	0,009	25	0,3	25	0,1	25
Румыния / Romania					0,1	29	0,02	9			0,29	21			0,01	21		
Сербия / Serbia					0,1	12					0,61	7	0,01	4	0,1	13	0,35	14
Словакия / Slovakia					0,06	8	0,06	7			0,02	2			0,02	8	0,2	12
Словения / Slovenia			0,05	1	0,2	12	0,3	12			0,05	2			0,1	8	0,1	9
Таджикистан / Tajikistan																		
Туркменистан / Turkmenistan																		
Турция / Turkey					24,4	25			0,75	17	0,01	9	0,35	26	13,8	30		
Узбекистан / Uzbekistan																		
Украина / Ukraine																		
Финляндия / Finland																		
Франция / France			0,003	25	0,001	9	0,005	7			0,004	14	0,0005	7	0,08	28		
Хорватия / Croatia					0,17	17	0,04	7			0,33	7	0,04	11	0,06	12	1,2	16
Черногория / Montenegro					0,2	4	0,3	1			0,3	2			0,3	9		
Чехия / Czech Republic																		
Швейцария / Switzerland			0,02	3	2,85	20	1,05				0,01	4			0,07	20	0,5	16
Швеция / Swiss			0,01	4	1,5	12					0,01	4			0,11	13	3,45	12
Эстония / Estonia																		

Примечания: ИП – интенсивный показатель; N – число лет регистрации;

Note: PI – intensive indicator, N – the number of years of case registration;

– наличие в стране энзоотичной территории или природных очагов, данных о местной заболеваемости нет / the presence of enzootic territory or natural foci in the country, there is no data on local morbidity;

– регистрация завозных заболеваний (на территории есть условия местной передачи инфекции) / registration of imported cases of the disease (there are conditions for local transmission of infection in the territory);

– вспышки в отдельные годы / outbreaks in certain years;

– регистрация местных случаев заболевания / registration of local cases of the disease;

– развитие эпидемических осложнений в результате завозов болезни / the development of epidemic complications as a result of the importation of the disease.

саны в 1770 г. (Тифлис). Заболевания людей чумой, как правило, совпадали со вспышками заболевания на других территориях Закавказья и, вероятно, были связаны с заносами инфекции, в последний раз – в 1920 г. [10]. После 35-летнего отсутствия эпидемических проявлений чумы в Российской Федерации, с 2014 по 2016 год на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага (район Кош-Агач Республики Алтай) ежегодно регистрировали по одному случаю заболевания чумой бубонной формы. До этого единичные случаи заражения в стране имели место в 1947–1948, 1954, 1960, 1979 гг. [9]. На территории Турции случаи чумы, наиболее вероятно, были связаны с заносами возбудителя морскими путями в портовые города с возникновением эпизоотий в популяции местных синантропных грызунов. Последняя вспышка чумы в стране зарегистрирована на границе с Сирией в районе Акчакале в 1947 г. [11]. В Израиле эпидемические проявления чумы отмечались в период с 1941 по 1947 год: выявлено 198 заболевших, включая 65 летальных исходов [12].

Холера. За последний 30-летний период (1990–2020 гг.) в странах Восточной Европы крупные вспышки холеры регистрировались в Румынии. С 1990 по 1995 год зарегистрировано в общей сложности 712 случаев холеры (в 1990 г. – 270 случаев заболевания; в 1991 г. отмечена вспышка, связанная с завозом из Турции, – 226 случаев; в 1994 г. – 80, в том числе 46 завозных). Последняя вспышка холеры отмечена 4 августа – 7 октября 1995 г. – 118 случаев заболевания [13]. Кроме того, распространение болезни отмечено на Украине, где произошла вспышка в 2011 г. с регистрацией 32 больных и 22 вибрионосителей, и в Молдове (1999 и 2000 гг. – по 1 случаю) [14]. Заносы холеры отмечены в Белоруссии (1994, 1995 гг.), Венгрии (1997 г.), Польше (1994, 2019 гг.) и Чехии (2002, 2017 гг.).

В странах Западной Европы регистрируются только завозные случаи холеры, в основном у возвращающихся туристов (как правило, из стран Азии) или иммигрантов из стран Африки и Ближнего Востока. Последний эпизод реализации заноса холерного вибриона произошел в 1986 г. во Франции, когда диагностировано 35 завозных и 2 местных случая [15]. По данным ВОЗ, зафиксированы заносы холеры в Австрию (1990, 1993, 1994, 1996, 1998, 1999, 2002, 2005, 2008, 2012, 2013 гг.), Бельгию (2004, 2005, 2007, 2015, 2016, 2018 гг.), Швейцарию (2006, 2015, 2019 гг.). В Нидерландах отмечают спорадические завозные случаи болезни (последний отмечен в 2020 г. из Того). Наибольшее число завезенных случаев холеры в регионе ежегодно регистрируют в Великобритании и Германии.

В Северной Европе случаи холеры регистрируются крайне редко. По данным ВОЗ, завозы болезни отмечены в Швеции (с 2009 по 2018 год ежегодно по одному случаю), Финляндии (1994, 1995, 1998, 2003, 2005, 2014 гг.), Эстонии (1993 г.) и Дании (2011, 2016, 2019 гг.).

В прошлом крупные вспышки холеры регистрировались во многих странах Южной Европы. Наиболее часто вспышки были связаны с употреблением в пищу сырых или недостаточно термически обработанных моллюсков или рыбы: в Португалии (в 1974–1975 гг. 2467 и 1066 случаев соответственно) [16], в Италии (1973 г. – 278 случаев, 1979 г. – 10, 1994 г. – 12, 1998 г. – 2) и Испании (1987, 1989 гг.) [17]. В настоящее время фиксируют только завозные случаи болезни: Испания (2001, 2002, 2006, 2007, 2008, 2013, 2015, 2016 гг.), Португалия (1994, 1995, 2005 гг.).

Крупные вспышки холеры на Балканах регистрировались в период с 1910 по 1922 год. В настоящее время случаев холеры на полуострове не отмечают с 1994 г.

Холера была широко распространенным заболеванием в странах СНГ в прошлом. В Грузии достаточно интенсивная вспышка произошла в 1970 г. – 39 больных и 14 вибрионосителей. В том же году в г. Батуми зарегистрировано 15 самостоятельных очагов инфекции с 16 больными и вибрионосителями, отмечающими факт купания на городском пляже. В 1981 г. зарегистрировано 10 больных и 4 вибрионосителя. В 1998 г. зарегистрирована крупная вспышка холеры Эль Тор в с. Зартонк Аршавирского района Республики Армения – госпитализированы 270 человек; причиной стала остановка очистной станции в Армавирском марзе, в результате чего поля и сады деревень затопило необеззараженными канализационными стоками. Местные случаи холеры в Азербайджане зарегистрированы в 1977 г. – 62 случая, в 1981 г. – 19, в 1985 г. – 48, в 1989 г. – 64 случая болезни. В Киргизии эпидемические проявления отмечались в 1993 г. В Казахстане эпидемиологические осложнения по холере связаны только с завозом инфекции из других стран. Завозы холеры на территорию республики зарегистрированы в 1993, 1994, 1995, 1997, 1998, 2000, 2001, 2005, 2017 гг. За период с 1990 по 2020 год в странах СНГ вспышки и спорадические случаи болезни отмечены в Грузии (1994 г.), Азербайджане (1993, 1994, 1995, 1998, 2001, 2009 гг.), России (2010, 2012, 2014 гг.) и Таджикистане (2009 г.), в основном завозного происхождения. Изоляция при этом различных по эпидемической значимости холерных вибрионов из поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды в странах СНГ позволяет в целом оценить ситуацию в регионе как нестабильную [9, 18].

Малярия. В прошлом заболевание имело широкое распространение во многих европейских странах. Широкомасштабные оздоровительные мероприятия, направленные прежде всего на борьбу с переносчиком возбудителя малярии, позволили значительно сократить заболеваемость малярией в регионе, а в большинстве стран – полностью искоренить болезнь. В начале 1990-х гг. наличие остаточных резервуаров малярийной инфекции вкупе с массовой миграцией населения, масштабными проектами строительства,

а также ослаблением кампаний по профилактике малярии и борьбе с ней создали благоприятные условия для передачи болезни. Вследствие этого вспышки малярии возникли в Центральной Азии и странах Кавказа. В период между 1995 и 2005 гг. благодаря масштабным мероприятиям по сдерживанию малярии количество местных случаев значительно снизилось. Заболевание удалось взять под контроль благодаря интенсивным мерам по борьбе с переносчиками, эффективному лечению больных и надлежащему эпиднадзору. Практически все регистрируемые случаи малярии в европейских странах в настоящее время завезены из эндемичных районов.

Из девяти стран, в которых в 2000 г. продолжалась передача малярии, четыре страны сертифицированы в качестве свободных от нее (Туркменистан – в 2010 г., Армения – 2011 г., Казахстан – 2012 г. и Киргизия – 2016 г.). В 2009 г. в Таджикистане и в 2013 г. в Азербайджане была прервана передача автохтонной малярии, и в настоящее время страны проходят сертификацию по элиминации малярии. В Грузии последний местный случай заболевания зафиксирован в 2009 г., однако в настоящее время риск передачи малярии, вызываемой *Plasmodium vivax*, локально существует с июня по октябрь в восточной части страны [19]. В Турции местная передача малярии не регистрируется с 2009 г., однако высокая численность переносчиков болезни обуславливает регистрацию вторичных единичных случаев от завозных. Серьезную проблему для здравоохранения в тех странах Европы, где малярия успешно искоренена, представляют завозные случаи в связи с наличием эффективных переносчиков – комаров рода *Anopheles* [20]. Каждый год в регионе регистрируется около 5000 случаев завоза малярии. Реализация местной передачи малярии от завозных случаев отмечалась в Греции, Болгарии, Италии и Молдове. В Бельгии (2020 г.), Испании (1984, 2010 гг.), Италии (1985, 1988 гг.), Франции (с 1977 по 2000 год – 28 случаев) регистрировались местные случаи «аэропортной малярии» [21].

Полиомиелит. После объявленной в 1988 г. ВОЗ Глобальной программы по ликвидации полиомиелита, целью которой являлось не только снижение заболеваемости до нулевого уровня, но и доказанное прекращение циркуляции дикого полиовируса, в Европейском регионе ВОЗ на фоне общего снижения заболеваемости все еще оставались проблемные районы. За период с 1990 по 1998 год в Европейском регионе ВОЗ зарегистрировано 1038 случаев полиомиелита (Азербайджан – 251 случай, Грузия – 36, Таджикистан – 112, Болгария – 46, Румыния – 13, Нидерланды – 71, Югославия – 10, Украина – 27, Узбекистан – 120, Россия – 151, Албания – 138, Греция – 5, Косово – 25, Турция – 33 случая). Циркуляция диких полиовирусов в Европе прекратилась в 1998 г., а регистрация Европейского региона ВОЗ как территории, свободной от полиомиелита, состоялась в июне 2002 г.

Примером способности полиовируса легко импортироваться в любую страну с последующим быстрым распространением является вспышка в Таджикистане в апреле 2010 г., в течение которой в общей сложности выявлено 706 заболевших, у 458 человек диагноз полиомиелита подтвержден лабораторно. Произошло дальнейшее распространение вируса в Россию (14 случаев), Туркменистан (3) и Казахстан (1). Республика Таджикистан статус свободной от полиомиелита страны получила лишь в 2012 г. В настоящее время риск возобновления передачи полиомиелита в Европе расценивается ВОЗ как крайне низкий, однако существенные опасения в плане обострения эпидемиологической обстановки вызывают циркулирующие в регионе вакциноассоциированные штаммы полиовируса. Территории, на которых циркулируют штаммы вакцинного происхождения, постепенно расширяются, вакцинный штамм обнаруживают и в объектах окружающей среды. Однако, как и вспышки дикого полиовируса, вспышки вакциноассоциированного полиомиелита можно остановить с помощью качественной кампании по иммунизации [9].

Арбовирусные инфекции. Проблема арбовирусных лихорадок является актуальной для Европейского региона ВОЗ, что связано с наличием природных очагов лихорадки Западного Нила и Крымской геморрагической лихорадки, а также отчетливо обозначившимся риском местной передачи вирусов денге, Зика и чикунгунья.

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН). Впервые в Европейском регионе ВОЗ вирус Западного Нила (ВЗН) выделен на территории Израиля в 1951 г., где в последующем (1952, 1953, 1957, 1962 и 1980 гг.) регистрировались небольшие вспышки, как правило, с благоприятным клиническим исходом. В континентальной Европе доказательства циркуляции ВЗН получены при выявлении специфических антител в сыворотке крови двух лихорадящих больных в Албании в 1958 г. Официально о спорадических случаях заболевания и эпизоотиях среди лошадей сообщалось во Франции в 1960-е гг., однако результаты мониторинговых исследований свидетельствовали о более широком распространении ЛЗН в Южной, Центральной и Восточной Европе [22]. Первые упоминания о ЛЗН в России относятся к 1963 г., когда вирус изолирован от клещей *Hyalomma marginatum*, снятых с грачей, а в 1967 г. подтверждены случаи заболевания (Астраханская область) [23]. В последующие три десятилетия ЛЗН не рассматривалась как болезнь, требующая внимания со стороны общественного здравоохранения. В 1990-х гг. на фоне стремительного расширения ареала ВЗН и осложнения эпидемиологической обстановки в ряде стран мира относительно крупные вспышки ЛЗН с проявлением ее наиболее опасной нейроинвазивной формы отмечены в Румынии (1996 г., 393 случая), юге европейской части России (1999 г., 475 случаев), Израиле (2000 г., 417 случаев). С 2010 г. в регионе наблюда-

ется резкий подъем заболеваемости, сопровождающийся ежегодной регистрацией случаев заболевания и появлением вируса на новых для него территориях (табл. 2). Наиболее крупные вспышки ЛЗН в Европе регистрировались в Греции – в 2010 г. (262 случая), 2018 г. (316), 2019 г. (227), России – в 2010 г. (523), 2012 г. (447), 2019 г. (352), Сербии – в 2013 г. (300), Венгрии – в 2018 г. (215), Румынии – в 2018 г. (277), Италии – в 2018 г. (610 случаев).

В настоящее время ЛЗН широко распространена в странах Европейского региона, ее ареал на севере включает Германию и Нидерланды. Заболеваемость регистрируется в основном в июле – сентябре – в период максимальной численности и активности переносчиков ВЗН.

Имеется информация о выявлении маркеров ВЗН в носителях и переносчиках в Азербайджане, Армении, Грузии, Казахстане (также получены положительные серологические результаты при обследовании местных жителей), Таджикистане и

Узбекистане [3]. На территориях неэндемичных стран Европы регистрируются завозные случаи ЛЗН: в Бельгии, Великобритании, Дании, Ирландии, Чехии, Швеции и Швейцарии.

Лихорадка денге. В настоящее время лихорадка денге является самой частой причиной лихорадки у европейских путешественников, возвращающихся из эндемичных территорий. В страны Европейского региона импортируется в среднем ежегодно более 2 тыс. случаев лихорадки денге. Наибольшее количество завозных случаев регистрируется в Германии, Великобритании и Франции. Ежегодная интродукция вируса денге путешественниками и трудовыми мигрантами, завоз и укоренение на отдельных территориях инвазивных видов комаров *Aedes aegypti* и *Ae. albopictus* обуславливают риски местной передачи этой инфекции. Известно, что в прошлом на территории Европы имел широкое распространение комар *Ae. aegypti* – основной переносчик вируса денге. Наиболее крупная эпидемия лихорадки денге с высокой смертностью зарегистрирована в 1927–1928 гг. в Афинах (Греция), когда, по оценкам, заболело 650 тыс. человек, а у 1061 из них заболевание закончилось летальным исходом [24]. В первой половине XX в. *Ae. aegypti* исчез из Европы, и только в 2004 г. появились сообщения о его повторной колонизации. В настоящее время присутствие комара *Ae. aegypti* установлено на территории Грузии, Португалии (о. Мадейра), России (Черноморское побережье, последние находки – в 2014 г.), Абхазии и Турции. Вторым по значимости переносчиком вируса денге – комар *Ae. albopictus* – начиная с 1979 г., когда он впервые обнаружен в Албании, выявлен в большинстве стран региона. Наиболее высокая плотность популяции данного вида переносчика отмечается в странах Европы, расположенных на побережье Средиземного моря (Испания, Франция, Италия, Греция). В России *Ae. albopictus* впервые отмечен на Черноморском побережье в п. Хоста в 2011 г. За период 2011–2020 гг. этот вид распространился от границы с Абхазией вдоль побережья до Анапы и вглубь материка от Новороссийска до Кореновска, а в 2019 г. впервые обнаружен на Крымском полуострове [25]. Начиная с 2010 г. в континентальной Европе отмечено несколько эпизодов местной передачи в Хорватии, Франции, Италии и Испании (всего 79 случаев). В 2012 г. на о. Мадейра произошла самая крупная из известных вспышек, сопровождавшаяся выносом болезни в материковую Португалию и 12 других стран Европы с регистрацией 78 местных случаев.

Что касается других арбовирусных инфекций, передаваемых комарами, то в странах региона установлены случаи местной передачи вирусов Зика (Франция, 2019 г.) и чикунгунья (Италия, 2007 и 2017 гг.; Франция, 2010, 2014, 2017 гг.).

Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ). Наличие природных очагов КГЛ установлено на территориях 22 стран Европейского региона: Азербайджан, Албания, Армения, Болгария, Греция,

Таблица 2 / Table 2

Европейские страны, на территориях которых зарегистрированы местные случаи заболевания ЛЗН среди населения

European countries in the territory of which local cases of WNF are reported among the population

Страна / Country	Год регистрации заболеваемости ЛЗН Years when WNF incidence was registered
Австрия / Austria	2009–2010, 2012, 2014–2019
Албания / Albany	2010–2012
Беларусь / Belarus	1996, 2019
Болгария / Bulgaria	2012, 2015–2020
Босния и Герцеговина / Bosnia and Herzegovina	2010, 2012, 2014, 2018
Венгрия / Hungary	2003–2020, ежегодно (annually)
Германия / Germany	2018–2019
Греция / Greece	2010–2020, ежегодно (annually)
Израиль / Israel	2000–2020, ежегодно (annually)
Испания / Spain	2004, 2010, 2016, 2020
Италия / Italy	2008–2020, ежегодно (annually)
Кипр / Cyprus	2018, 2019
Северная Македония / North Macedonia	2010–2014, 2019
Молдова / Moldova	2019
Нидерланды / Netherlands	2020
Португалия / Portugal	2004, 2010, 2015
Россия / Russian Federation	1997–2020
Румыния / Romania	1996–2020, ежегодно (annually)
Сербия / Serbia	2012–2020, ежегодно (annually)
Словакия / Slovakia	2018, 2019
Словения / Slovenia	2013, 2018
Турция / Turkey	2010, 2012–2014, 2016, 2017–2019
Украина / Ukraine	2006–2013
Франция / France	2003, 2005–2007, 2009–2013, 2015–2019
Хорватия / Croatia	2012–2018, ежегодно (annually)
Черногория / Montenegro	2012, 2013

Грузия, Испания, Италия, Казахстан, Киргизия, Молдова, Португалия, Россия, Румыния, Сербия, Македония, Таджикистан, Туркменистан, Турция, Узбекистан, Украина и Франция. Есть основания считать ареал КГЛ в странах Европы еще более широким в связи со сходными особенностями экологии вируса Конго-Крымской геморрагической лихорадки (ККГЛ) и широким распространением эффективных переносчиков болезни [3]. Наиболее сложная эпидемиологическая обстановка по КГЛ складывается в Турции, где за период с 2002 по 2020 год зарегистрировано более 5 тыс. лабораторно подтвержденных случаев заболевания [26, 27]. В Республике Казахстан случаи КГЛ отмечаются ежегодно. Показатель заболеваемости населения КГЛ по республике за 2008–2018 гг. колеблется от 0,04 до 0,3 на 100 тыс. населения. Среднее ежегодное число случаев заболевания людей в Республике Таджикистан обычно колеблется от 1 до 6; вспышки отмечены в 1967 г. (21 случай), 1991 г. (9), 1993 г. (5), 2001 г. (26), 2007 г. (29), 2008 г. (37), 2009 г. (29). Периодически регистрируются нозокомиальные случаи заражения: вспышки в 1993, 2001 и 2009 гг. возникли в условиях стационара в результате инфицирования кровью больных людей [28]. Ежегодно случаи заболевания отмечаются в Болгарии (211 случаев за период с 2000 по 2020 год). Заболеваемость КГЛ в России регистрируется с 1948 г. За период с 2014 по 2020 год в целом по России зарегистрировано 707 случаев заболевания КГЛ. В Грузии с момента начала эпиднадзора за КГЛ в 2009 г. ежегодное количество случаев заболевания постепенно увеличивается. За период с 2013 по 2019 год на территории республики зарегистрировано 72 случая заболевания [29]. В Греции с 2008 г. наблюдается спорадическая заболеваемость. В Испании случаи заболевания людей отмечены в 2016, 2018 и 2020 гг. Как правило, заболеваемость КГЛ регистрируется среди жителей сельских районов, а большинство заболевших отмечают укусы клещей и/или контакт с животными [30]. Маркеры вируса ККГЛ при исследовании клещей обнаружены на территориях Азербайджана, Италии, Киргизии, Молдовы. Циркуляция вируса ККГЛ, выявленная при серологическом исследовании животных (крупного – КРС и мелкого рогатого скота – МРС), подтверждена в Армении, Румынии и Франции (о. Корсика). Единственным доказательством возможной локальной циркуляции возбудителя в Португалии являются результаты серологического обследования жителей южной части страны в 1980-х гг. В исследовании установлен низкий уровень иммунной прослойки (2 положительных сыворотки из 258 исследуемых) [31]. Завозы КГЛ отмечены на территорию Великобритании (в 1998, 2012 и 2014 гг.) и Германии (в 2001 и 2009 гг.).

Наиболее актуальные зоонозные болезни региона

Бруцеллез. Бруцеллез остается одним из основных заболеваний во многих европейских странах,

не только где болезнь является эндемичной, но и в странах, которые официально свободны от бруцеллеза, в связи с ввозом инфицированных животных из неблагополучных по бруцеллезу стран. Бруцеллез – эндемичное заболевание в странах Центральной Азии и Южного Кавказа, где наблюдаются одни из самых высоких в мире показателей заболеваемости бруцеллезом. Основными причинами неблагоприятной ситуации по бруцеллезу на данных территориях являются неполный охват сельскохозяйственных животных вакцинацией, слабый контроль за передвижением и забоем скота, недостаточная идентификация животных, продолжающаяся реализация мясо-молочных продуктов на стихийных рынках без ветеринарного освидетельствования и несоблюдение населением правил личной гигиены при уходе за животными [3]. Случаи заболевания ежегодно регистрируются в Армении (среднегодовой показатель заболеваемости составляет 7,7 на 100 тыс. населения), Азербайджане (5,5), Грузии (3,9), Казахстане (13,5). По заболеваемости бруцеллезом Киргизия занимает первое место среди стран Европейского региона ВОЗ, где ежегодно регистрируется от 400 до 4000 случаев заболевания (40,45 на 100 тыс. населения), хотя в последнее время прослеживается тенденция снижения заболеваемости. Неблагополучие по бруцеллезу сохраняется на Балканах. За счет снижения охвата животных вакцинацией в 2000-х гг. на территории Албании отмечался резкий рост заболеваемости бруцеллезом. В настоящее время в стране ежегодно выявляют до 20 случаев заболевания среди сельскохозяйственных работников. В Боснии и Герцеговине бруцеллез широко распространен среди домашних животных, и, как следствие, часто происходит передача инфекции населению (5,5 на 100 тыс. населения). Как правило, заражение связано с профессиональной деятельностью. Большинство случаев заболевания регистрируют в городах Добой, Тузла, Сараево, Баня-Лука и Зеница [32]. Уровень заболеваемости бруцеллезом в Греции один из самых высоких в Европейском регионе. Эндемична вся территория страны, наиболее высокий риск заражения бруцеллезом отмечается в сельских районах центральной части Греции. Случаи бруцеллеза регистрируются у лиц, контактирующих с животными ввиду профессиональной деятельности (пастухи, работники животноводства, ветеринары), либо связаны с употреблением непастеризованного молока или молочных продуктов [33]. Ежегодно заболеваемость отмечается в Македонии (12,6 на 100 тыс. населения). В Израиле заболеваемость бруцеллезом регистрируется по всей стране; высокоэндемичен южный регион. В последние годы все чаще поступают сообщения о вспышках бруцеллеза в тех частях Израиля, которые ранее были свободны от бруцеллеза. Случаи заболевания бруцеллезом среди домашних животных на протяжении последних десятилетий в Израиле вызваны исключительно *Brucella melitensis*, так же как и случаи заболевания людей. Широко рас-

пространен бруцеллез и в Турции (ежегодно от 4 до 10,2 тыс. случаев). Заболевание высокоэндемично в центральном регионе страны. Преобладают случаи заболевания, вызванные *B. melitensis*, в меньшей степени – *B. abortus*. Описаны отдельные случаи заражения человека *B. canis* [34]. В Российской Федерации эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу остается напряженной. Средний многолетний показатель заболеваемости (за 10 лет) составляет 0,24 на 100 тыс. населения и имеет тенденцию к снижению. Большинство случаев регистрируется в Дагестане и Ставропольском крае. Эпидемиологические проявления бруцеллеза на территории страны связаны с активностью эпизоотического процесса среди основных эпидемиологически значимых видов сельскохозяйственных животных – МРС и в большей степени КРС. Несмотря на то, что в большинстве стран Европы разработаны стратегии по искоренению бруцеллеза у жвачных животных и предотвращению заражения людей, бруцеллез все еще остается серьезной проблемой общественного здравоохранения в регионе.

Сибирская язва. Неблагополучная обстановка по сибирской язве сохраняется в большинстве стран Европы, а наиболее тяжелая ситуация складывается на территориях стран Центральной Азии и Южного Кавказа, где ежегодно регистрируются эпизоотии среди животных, приводящие к инфицированию людей. Большое число почвенных очагов и низкий охват вакцинацией (в некоторых регионах – полное ее отсутствие) приводят к заболеванию сельскохозяйственных животных, а контакт с больными животными и инфицированным мясом является причиной заболевания людей. Ежегодно случаи заболевания среди населения регистрируют в Казахстане, Таджикистане и Армении. Неблагополучная эпидемиологическая обстановка по сибирской язве складывается в Грузии. Всего за период с 2000 по 2016 год зарегистрировано 767 случаев заболевания человека. С 2017 г. в Грузии случаев сибирской язви не отмечалось. Практически ежегодно сибирская язва регистрируется в Республике Киргизия. В России заболеваемость носит, как правило, спорадический характер. В 2016 г. на территории страны выявлена самая крупная вспышка сибирской язви за последние годы (в Ямало-Ненецком автономном округе – 36 случаев заболевания среди населения). В прошлом сибирская язва в Европе имела широкое вспышечное распространение. За период с 1951 по 1980 год на Европейском континенте зарегистрировано более 50 тыс. случаев заболевания, большая часть из которых выявлена на территории Турции, Испании и Италии. Несмотря на снижение заболеваемости, сибирская язва по-прежнему распространена в странах Средиземноморья. В Турции случаи заболевания регистрируются ежегодно, хотя в последнее время заболеваемость имеет значительную тенденцию к снижению. Высокоэндемичны восточные и центральные регионы страны, где широко

развито сельское хозяйство и животноводство [35]. Ежегодно случаи заболевания людей регистрируются в Албании и Хорватии. Спорадическая заболеваемость отмечается в Боснии и Герцеговине, Греции и Испании. В южной Италии и на крупных островах, а также во Франции ежегодно регистрируются случаи сибирской язви среди невакцинированных травоядных животных, как правило, после выпаса на пастбищах [36]. В Израиле заболеваемость людей официально не регистрируется с 1985 г., однако имеются сообщения о единичных случаях заболевания среди КРС. В начале 2000-х гг. описаны новые пути передачи сибирской язви, связанные с употреблением героина, контаминированного спорами сибирской язви. В 2009 г. в Великобритании зарегистрированы 47 случаев сибирской язви инъекционной формы (летальность составила 34 %). Два аналогичных случая отмечены в Германии. В 2012 г. зарегистрировано 13 случаев инъекционной сибирской язви с летальностью в 42 %: 6 случаев выявлено в Великобритании, 4 – в Германии, 2 – в Дании и 1 – во Франции [37].

Представленный в статье материал позволяет дать ориентировочную оценку эпидемиологической ситуации в странах континентальной Европы, Западной и Центральной Азии, которая может быть востребована в качестве основы при осуществлении санитарно-карантинного контроля и проведении эпидемиологической диагностики в случае выявления больных инфекционными болезнями, прибывшими из указанных стран.

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

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Топорков В.П., Смоленский В.Ю., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Современные угрозы и вызовы в области биологической безопасности и стратегия противодействия. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 3:5–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-3-5-9.
2. Брико Н.И., Покровский В.И. Глобализация и эпидемический процесс. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2010; 4:4–10.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Санитарная охрана территории Российской Федерации в современных условиях. Саратов: Буква; 2014. 460 с.
4. Worldometers. Coronavirus. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.worldometers.info/coronavirus/> (дата обращения 01.07.2021).
5. Кутырев В.В., редактор. Распространение в мире инфекционных болезней, значимых для обеспечения эпидемиологического благополучия международных сообщений. Справочное эпидемиологическое издание. Т. 1. Восточно-Средиземноморский регион. [Электронный ресурс]. URL: http://www.microbe.ru/files/Reference_book_Vol1.pdf (дата обращения 01.07.2021).
6. United Nations. Department of Economic and Social Affairs. World Population Prospects 2019. [Электронный ресурс]. URL: <https://population.un.org/wpp/Download/Standard/Population/> (дата обращения 18.06.2021).
7. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 год). Саратов: Амирит; 2016. 248 с.
8. Садовская В.П., Кузнецов А.Н., Мека-Меченко В.Г., Асылбек А.М., Егизтаева Б.Т. Совершенствование эпидемиологического надзора за природными очагами чумы с использованием ГИС-технологий. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2019; 1(38):105–9.

9. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Реализация Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на пространстве Восточной Европы и Центральной Азии. Саратов: Амрит; 2019. С. 129–30.
10. Дятлов А.И., Антоненко А.Д., Грижебовский Г.М., Лабунец Н.Ф. Природная очаговость чумы на Кавказе. Ставрополь; 2001. 345 с.
11. Козлов М.П., Султанов Г.В. Чума (природная очаговость, эпизоотология). Т. 3. Махачкала: Дагестанское книж. изд-во; 2000. 304 с.
12. Pollitzer R. Plague studies. 1. A summary of the history and survey of the present distribution of the disease. *Bull World Health Organ.* 1951; 4(4):475–533.
13. Oprea M., Njamkepo E., Cristea D., Zhukova A., Clark C.G., Kravetz A.N., Monakhova E., Ciontea A.S., Cojocaru R., Rauzier J., Damian M., Gascuel O., Quilici M.L., Weill F.X. The seventh pandemic of cholera in Europe revisited by microbial genomics. *Nat. Commun.* 2020; 11(1):5347. DOI: 10.1038/s41467-020-19185-y.
14. Магдей М.В., Слюсарь В.Н., Гуцу А.В., Кикю В.Ф., Кожокару Р.И., Сохоцкий В.В. Проявления VII пандемии холеры в Республике Молдова. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2002; 2(84):84–92.
15. Tarantola A., Ioos S., Rotureau B., Paquet C., Quilici M.L., Fournier J.M. Retrospective analysis of the cholera cases imported to France from 1973 to 2005. *J. Travel. Med.* 2007; 14(4):209–14. DOI: 10.1111/j.1708-8305.2007.00129.x.
16. Blake P.A., Rosenberg M.L., Costa J.B., Ferreira P.S., Guimaraes C.L., Gangarosa E.J. Cholera in Portugal, 1974. I. Modes of transmission. *Am. J. Epidemiol.* 1977; 105(4):337–43. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a112391.
17. Ciofi Degli Atti M., Finarelli A.C., Pompa M.G., Toni F., Bella A., Callipari O., Luzzi I. A case of cholera imported from Senegal to Rimini, Italy, June 2005. *Euro Surveill.* 2005; 10(6):E050630.6. DOI: 10.2807/esw.10.26.02739-en.
18. Kokashvili T., Elbakidze T., Jaiani E., Janelidze N., Kamkamidze G., Whitehouse C., Huq A., Tediashvili M. Comparative phenotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates collected from aquatic environments of Georgia. *Georgian Med. News.* 2013; 224:55–62.
19. Kandelaki G., Butsashvili M., Kalandadze I., Iosava M., Avaliani N., Imnadze P. Elimination of malaria in country Georgia. *Acta Trop.* 2012; 123(1):47–8. DOI: 10.1016/j.actatropica.2012.02.068.
20. Askling H.H., Brunel F., Burchard G., Castelli F., Chiodini P.L., Grobusch M.P., Lopez-Vélez R., Paul M., Petersen E., Popescu C., Ramharter M., Schlagenhauf P. Management of imported malaria in Europe. *Malar. J.* 2012; 11:328. DOI: 10.1186/1475-2875-11-328.
21. Isaacs M. Airport malaria: a review. *Bull. World Health Organ.* 1989; 67(6):737–43.
22. Chancey C., Grinev A., Volkova E., Rios M. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res. Int.* 2015; 2015:376230. DOI: 10.1155/2015/376230.
23. Топорков А.В., редактор. Лихорадка Западного Нила. Волгоград: Волга-Пресс; 2017. 304 с.
24. Halstead S.B., Papaevangelou G. Transmission of dengue 1 and 2 viruses in Greece in 1928. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1980; 29(4):635–7. DOI: 10.4269/ajtmh.1980.29.635.
25. Сычева К.А., Швеиц О.Г., Медяник И.М., Журенкова О.Б., Федорова М.В. Итоги мониторинга ареала комара *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) в Краснодарском крае в 2019 г. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни.* 2020; 2:3–8. DOI: 10.33092/0025-8326mp2020.2.03-08.
26. Gözalan A., Akin L., Rolain J.M., Tapar F.S., Oncül O., Yoshikura H., Zeller H., Raoult D., Esen B. [Epidemiological evaluation of a possible outbreak in and nearby Tokat province]. *Mikrobiyol. Bul.* 2004; 38(1-2):33–44. [In Turkish].
27. Gozalan A., Esen B., Fitzner J., Tapar F.S., Ozkan A.P., Georges-Courbot M.C., Uzun R., Gumuslu F., Akin L., Zeller H. Crimean-Congo haemorrhagic fever cases in Turkey. *Scand. J. Infect. Dis.* 2007; 39(4):332–6. DOI: 10.1080/00365540601053014.
28. Тураев Р.А., Зиёев О.М., Андамов И.Ш., Субботина И.А. Зооантропонозные болезни в Республике Таджикистан и меры борьбы с ними. *Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины».* 2019; 55(2):72–6.
29. Kuchuloria T., Imnadze P., Chokheli M., Tsertsvadze T., Endeladze M., Mshvidobadze K., Clark D.V., Bautista C.T., Abdel Fadel M., Pimentel G., House B., Hepburn M.J., Wölfel S., Wölfel R., Rivard R.G. Viral hemorrhagic fever cases in the country of Georgia: Acute febrile illness surveillance study results. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 91(2):246–8. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0460.
30. Palomar A.M., Portillo A., Santibáñez S., García-Álvarez L., Muñoz-Sanz A., Márquez F.J., Romero L., Eiros J.M., Oteo J.A. Molecular (ticks) and serological (humans) study of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the Iberian Peninsula, 2013–2015. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 2017; 35(6):344–47. DOI: 10.1016/j.eimc.2017.01.009.
31. Filipe A.R., Calisher C.H., Lazwick J. Antibodies to Congo-Crimean haemorrhagic fever, Dhori, Thogoto and Bhanja viruses in southern Portugal. *Acta Virol.* 1985; 29(4):324–8.
32. Serić-Haracić S., Salman M., Fejzić N., Cavaljuga S. Brucellosis of ruminants in Bosnia and Herzegovina: disease status, past experiences and initiation of a new surveillance strategy. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2008; 8(1):27–33. DOI: 10.17305/bjbm.2008.2991.
33. Fouskis I., Sandalakis V., Christidou A., Tsatsaris A., Tzanakis N., Tselentis Y., Psaroulaki A. The epidemiology of Brucellosis in Greece, 2007–2012: a ‘One Health’ approach. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2018; 112(3):124–35. DOI: 10.1093/trstmh/try031.
34. Kutlu M., Cevahir N., Erdenliç-Gürbilek S., Akalın Ş., Uçar M., Sayın-Kutlu S. The first report of *Brucella suis* biovar 1 isolation in human in Turkey. *J. Infect. Public Health.* 2016; 9(5):675–8. DOI: 10.1016/j.jiph.2016.01.011.
35. Doganay M., Metan G. Human anthrax in Turkey from 1990 to 2007. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009; 9(2):131–40. DOI: 10.1089/vbz.2008.0032.
36. Patra G., Vaissaire J., Weber-Levy M., Le Doujet C., Mock M. Molecular characterization of *Bacillus* strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(11):3412–4. DOI: 10.1128/JCM.36.11.3412-3414.1998.
37. Супотницкий М.В. Героиновая сибирская язва в Шотландии и Германии. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2011; 1:40–4.

References

1. Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Toporkov V.P., Smolensky V.Yu., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. [Present-day menaces and challenges in the sphere of biological safety and strategy of countermeasures]. *Problemny Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (3):5–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-3-5-9 11.
2. Briko N.I., Pokrovsky V.I. [Globalization and the epidemic process]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2010; 4:4–10.
3. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Sanitary protection of the territory of the Russian Federation under current conditions]. Saratov: “Bukva”; 2014. 460 p.
4. Worldometers. Coronavirus. (Cited 01 July 2021). [Internet]. Available from: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>.
5. Kutyrev V.V., editor. [The spread of infectious diseases in the world that are significant for ensuring the epidemiological welfare of international communications. Reference epidemiological publication]. Vol. 1. East Mediterranean Region. (Cited 01 July 2021). [Internet]. Available from: http://microbe.ru/files/Reference_book_Vol1.pdf.
6. United Nations. Department of Economic and Social Affairs. World Population Prospects 2019. (Cited 18 June 2021). [Internet]. Available from: <https://population.un.org/wpp/Download/Standard/Population/>.
7. Popova A.Y., Kutyrev V.V., editors. [Cadastre of Epidemic and Epizootic Manifestations of Plague in the Territory of the Russian Federation and Neighboring Countries (1876–2016)]. Saratov: LLC “Amirit”; 2016. 248 p.
8. Sadovskaya V.P., Kuznetsov A.N., Meka-Mechenko V.G., Asylbek A.M., Egiztaeva B.T. [Improving epidemiological surveillance over natural plague foci using GIS technologies]. *Karantinnye i Zoonoznye Infektsii v Kazakhstane [Journal of Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. 2019; 1(38):105–9.
9. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Implementation of the International Health Regulations (2005) in the Space of Eastern Europe and Central Asia]. Saratov: LLC “Amirit”; 2019. P. 129–130.
10. Dyatlov A.I., Antonenko A.D., Grizhebovsky G.M., Labunets N.F. [Natural Focality of Plague in the Caucasus]. Stavropol; 2001. 345 p.
11. Kozlov M.P., Sultanov G.V. [The Plague (Natural Focality, Epizootology)]. Vol. 3. Makhachkala: Dagestan Book Publishing House; 2000. 304 p.
12. Pollitzer R. Plague studies. 1. A summary of the history and survey of the present distribution of the disease. *Bull World Health Organ.* 1951; 4(4):475–533.
13. Oprea M., Njamkepo E., Cristea D., Zhukova A., Clark C.G., Kravetz A.N., Monakhova E., Ciontea A.S., Cojocaru R., Rauzier J., Damian M., Gascuel O., Quilici M.L., Weill F.X. The seventh pandemic of cholera in Europe revisited by microbial genomics. *Nat. Commun.* 2020; 11(1):5347. DOI: 10.1038/s41467-020-19185-y.
14. Magdey M.V., Slysar’ V.N., Gutsu A.V., Kiku V.F., Cozhokaru R.I., Sokhotsky V.V. [Manifestations in the VII cholera pandemic in the Republic of Moldova]. *Problemny Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2002; (2(84)):84–92.
15. Tarantola A., Ioos S., Rotureau B., Paquet C., Quilici M.L., Fournier J.M. Retrospective analysis of the cholera cases imported to France from 1973 to 2005. *J. Travel. Med.* 2007; 14(4):209–14. DOI: 10.1111/j.1708-8305.2007.00129.x.

16. Blake P.A., Rosenberg M.L., Costa J.B., Ferreira P.S., Guimaraes C.L., Gangarosa E.J. Cholera in Portugal, 1974. I. Modes of transmission. *Am. J. Epidemiol.* 1977; 105(4):337–43. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a112391.
17. Ciofi Degli Atti M., Finarelli A.C., Pompa M.G., Toni F., Bella A., Callipari O., Luzzi I. A case of cholera imported from Senegal to Rimini, Italy, June 2005. *Euro Surveill.* 2005; 10(6):E050630.6. DOI: 10.2807/esw.10.26.02739-en.
18. Kokashvili T., Elbakidze T., Jaiani E., Janelidze N., Kamkamidze G., Whitehouse C., Huq A., Tediashvili M. Comparative phenotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates collected from aquatic environments of Georgia. *Georgian Med. News.* 2013; (224):55–62.
19. Kandelaki G., Butsashvili M., Kalandadze I., Iosava M., Avaliani N., Imnadze P. Elimination of malaria in country Georgia. *Acta Trop.* 2012; 123(1):47–8. DOI: 10.1016/j.actatropica.2012.02.068.
20. Askling H.H., Bruneel F., Burchard G., Castelli F., Chiodini P.L., Grobusch M.P., Lopez-Vélez R., Paul M., Petersen E., Popescu C., Ramharter M., Schlagenhauf P. Management of imported malaria in Europe. *Malar. J.* 2012; 11:328. DOI: 10.1186/1475-2875-11-328.
21. Isaacson M. Airport malaria: a review. *Bull. World Health Organ.* 1989; 67(6):737–43.
22. Chancey C., Grinev A., Volkova E., Rios M. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res. Int.* 2015; 2015:376230. DOI: 10.1155/2015/376230.
23. Toporkov A.V., editors. [West Nile Fever]. Volgograd: "Volga-Press Publishing House"; 2017. 304 p.
24. Halstead S.B., Papaevangelou G. Transmission of dengue 1 and 2 viruses in Greece in 1928. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1980; 29(4):635–7. DOI: 10.4269/ajtmh.1980.29.635.
25. Sycheva K.A., Shvets O.G., Medyanik I.M., Zhurenkova O.B., Fedorova M.V. [Results of monitoring the areal of the *Aedes albopictus* mosquito (Skuse, 1895) in the Krasnodar Territory]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2020; 2:3–8. DOI: 10.33092/0025-8326mp2020.2.03-08.
26. Gözalan A., Akin L., Rolain J.M., Tapar F.S., Oncül O., Yoshikura H., Zeller H., Raoult D., Esen B. [Epidemiological evaluation of a possible outbreak in and nearby Tokat province]. *Mikrobiyol. Bul.* 2004; 38(1-2):33–44. [In Turkish].
27. Gozalan A., Esen B., Fitzner J., Tapar F.S., Ozkan A.P., Georges-Courbot M.C., Uzun R., Gumuslu F., Akin L., Zeller H. Crimean-Congo haemorrhagic fever cases in Turkey. *Scand. J. Infect. Dis.* 2007; 39(4):332–6. DOI: 10.1080/00365540601053014.
28. Turaev R.A., Ziyoev O.M., Andamov I.Sh., Subbotina I.A. [Anthropozoonotic diseases in the Republic of Tajikistan and measures to combat them]. *Scientific Notes of the Educational Institution "Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine"*. 2019; 55(2):72–6.
29. Kuchuloria T., Imnadze P., Chokheli M., Tsertsvadze T., Endeladze M., Mshvidobadze K., Clark D.V., Bautista C.T., Abdel Fadeel M., Pimentel G., House B., Hepburn M.J., Wölfel S., Wölfel R., Rivard R.G. Viral hemorrhagic fever cases in the country of Georgia: Acute febrile illness surveillance study results. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 91(2):246–8. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0460.
30. Palomar A.M., Portillo A., Santibáñez S., García-Álvarez L., Muñoz-Sanz A., Márquez F.J., Romero L., Eiros J.M., Oteo J.A. Molecular (ticks) and serological (humans) study of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the Iberian Peninsula, 2013–2015. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2017; 35(6):344–47. DOI: 10.1016/j.eimc.2017.01.009.
31. Filipe A.R., Calisher C.H., Lazouick J. Antibodies to Congo-Crimean haemorrhagic fever, Dhori, Thogoto and Bhanja viruses in southern Portugal. *Acta Virol.* 1985; 29(4):324–8.
32. Serić-Haracić S., Salman M., Fejzić N., Cavaljuga S. Brucellosis of ruminants in Bosnia and Herzegovina: disease status, past experiences and initiation of a new surveillance strategy. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2008; 8(1):27–33. DOI: 10.17305/bjbm.2008.2991.
33. Fouskis I., Sandalakis V., Christidou A., Tsatsaris A., Tzanakis N., Tselentis Y., Psaroulaki A. The epidemiology of Brucellosis in Greece, 2007–2012: a 'One Health' approach. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2018; 112(3):124–35. DOI: 10.1093/trstmh/trt031.
34. Kutlu M., Cevahir N., Erdenliğ-Gürbilek S., Akalın S., Uçar M., Sayin-Kutlu S. The first report of *Brucella suis* biovar 1 isolation in human in Turkey. *J. Infect. Public Health.* 2016; 9(5):675–8. DOI: 10.1016/j.jiph.2016.01.011.
35. Doganay M., Metan G. Human anthrax in Turkey from 1990 to 2007. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009; 9(2):131–40. DOI: 10.1089/vbz.2008.0032.
36. Patra G., Vaissaire J., Weber-Levy M., Le Doujet C., Mock M. Molecular characterization of *Bacillus* strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(11):3412–4. DOI: 10.1128/JCM.36.11.3412-3414.1998.
37. Supotnitsky M.V. [Heroin anthrax in Scotland and Germany]. *Biopreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie. [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]*. 2011; 1:40–4.

Authors:

Ivanova A.V., Dmitrieva L.N., Pospelov M.V., Kas'yan Zh.A., Zimirova A.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.
 Udovichenko S.K. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.
 Shiyanova A.E. Plague Control Center. 4, Musorgskogo St., Moscow, 127490, Russian Federation. E-mail: protivochym@nlm.ru.

Об авторах:

Иванова А.В., Дмитриева Л.Н., Поспелов М.В., Касьян Ж.А., Зимирова А.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.
 Удовиченко С.К. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.
 Шиянова А.Е. Противочумный центр. Российская Федерация, 127490, Москва, ул. Мусоргского, 4. E-mail: protivochym@nlm.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-27-34

УДК 616.98:578.833.1/2(597)

Ж.А. Касьян¹, Е.В. Найденкова¹, М.В. Проскурякова¹, Е.А. Михеева¹, Trinh Van Toan²,
Bui Thi Thanh Nga², Vo Viet Cuong², В.В. Кутырев¹

РАСПРОСТРАНЕНИЕ АРБОВИРУСОВ ВО ВЬЕТНАМЕ

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;²Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам

Арбовирусные инфекции на протяжении многих лет являются глобальной проблемой здравоохранения и одной из актуальных угроз санитарно-эпидемиологическому благополучию населения многих стран мира. Принципиальное значение для возникновения и поддержания природных очагов арбовирусных инфекций имеют климатические условия, видовое разнообразие и обилие переносчиков, эпидемиологические и демографические критерии. В Социалистической Республике Вьетнам (СРВ) и других странах Азиатско-Тихоокеанского региона наиболее сложная эпидемиологическая ситуация наблюдается по ряду арбовирусных инфекционных болезней, передающихся комарами, в частности по лихорадке денге. В данном обзоре проведен анализ литературных сведений по выявлению особенностей циркуляции вирусов денге, Зика, чикунгунья, японского энцефалита, Даби, эндемичных для Вьетнама, а также способов их передачи и распространения. В результате проведенного анализа показано, что природно-климатические, экологические, эпидемиологические и демографические условия, существующие в настоящее время на территории этого государства, способствуют распространению многих арбовирусов. Выявлены районы более активной циркуляции и массового распространения возбудителей арбовирусных инфекций. На основании полученных данных показана необходимость проведения ежегодного эпидемиологического и эпизоотологического обследования территории СРВ с целью выявления маркеров возбудителей и определения границ природных очагов арбовирусных инфекционных болезней, что позволит усовершенствовать и повысить эффективность профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Ключевые слова: арбовирусы, Социалистическая Республика Вьетнам, инфекционные болезни, лихорадка денге, лихорадка Зика, лихорадка чикунгунья, японский энцефалит, тяжелая лихорадка с синдромом тромбоцитопении.

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

Для цитирования: Касьян Ж.А., Найденкова Е.В., Проскурякова М.В., Михеева Е.А., Trinh Van Toan, Bui Thi Thanh Nga, Vo Viet Cuong, Кутырев В.В. Распространение арбовирусов во Вьетнаме. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:27–34. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-27-34
Поступила 08.12.2021. Принята к публ. 20.12.2021.

Zh.A. Kas'yan¹, E.V. Naidenova¹, M.V. Proskuryakova¹, E.A. Mikheeva¹, Trinh Van Toan²,
Bui Thi Thanh Nga², Vo Viet Cuong², V.V. Kuttyrev¹

Prevalence of Arboviruses in Vietnam

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;²Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center, Hanoi, Socialist Republic of Vietnam

Abstract. For many years, arbovirus infections have been a global health problem and one of the urgent threats to the sanitary and epidemiological well-being of the population. Climatic conditions, species diversity and abundance of vectors, epidemiological and demographic factors are of fundamental importance for the emergence and persistence of natural foci of arbovirus infections. In the Socialist Republic of Vietnam (SRV) and other countries of the Asia-Pacific region, the most complex epidemiological situation is observed in regard to a number of arboviral infectious diseases transmitted by mosquitoes, *inter alia* to dengue fever. In this review we analyzed the literature data to identify the features of the circulation of some arboviruses in Vietnam, such as dengue virus, Zika, Chikungunya, Japanese encephalitis virus, Dabie virus, and the routes of their transmission and spread. It is shown that the climatic, ecological, epidemiological and demographic conditions existing on the territory of Vietnam contribute to the spread of pathogens of many arboviruses. Areas of more active circulation and ways of spreading pathogens of arbovirus infections have been identified. Based on the data obtained, it is necessary to conduct annual epidemiological and epizootiological survey of the territory of the SRV in order to identify markers of pathogens and determine the boundaries of natural foci of arbovirus infectious diseases which will enhance and increase the effectiveness of preventive and anti-epidemic measures.

Key words: arboviruses, Socialist Republic of Vietnam, infectious diseases, dengue fever, Zika fever, Chikungunya fever, Japanese encephalitis, severe fever with thrombocytopenia syndrome.

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

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

Citation: Kas'yan Zh.A., Naidenova E.V., Proskuryakova M.V., Mikheeva E.A., Trinh Van Toan, Bui Thi Thanh Nga, Vo Viet Cuong, Kuttyrev V.V. Prevalence of Arboviruses in Vietnam. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:27–34. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-27-34

Received 08.12.2021. Accepted 20.12.2021.

Kas'yan Zh.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9828-3277>
Naidenova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>
Proskuryakova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7171-855X>

Mikheeva E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7218-2446>
Kuttyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

За последние 30 лет во всем мире наблюдается активизация природных очагов арбовирусных инфекционных болезней, примерами которой могут служить продолжающаяся географическая экспансия вирусов денге, крупные вспышки заболеваний людей, вызванные вирусами Западного Нила, чикунгуны и Зика [1, 2]. Это создает значительную угрозу мировому здравоохранению и служит напоминанием о том, что новые эпидемии могут возникнуть в любое время и на разных территориях.

Социалистическая Республика Вьетнам (СРВ) относится к странам, высокоэндемичным по ряду арбовирусных инфекционных болезней, таких как лихорадка денге, чикунгуна и Зика, а также по японскому энцефалиту [2–4]. **Целью** настоящего обзора являлось изучение и обобщение имеющихся в литературе данных об особенностях циркуляции некоторых арбовирусов на территории СРВ, способах их передачи и факторах распространения.

Государство СРВ расположено в Юго-Восточной Азии на полуострове Индокитай, на западе граничит с Лаосом и Камбоджей, на севере – с Китайской Народной Республикой (КНР). По климату территорию Вьетнама условно можно разделить на три района: Северный, Центральный и Южный (рисунок).

Северный район характеризуется влажным жарким летом и относительно прохладным зим-

ним периодом с конца ноября до середины апреля. На равнинах, включая дельты рек, средние температуры трех зимних месяцев составляют от 17 до 20 °С. В окрестностях г. Ханоя в наиболее прохладное время года температура держится от 14 до 16 °С, ночью понижается до 5–6 °С. В горах, на высоте более 1500 м, случаются заморозки. Выделяется летний, дождливый сезон, длящийся с апреля по сентябрь, когда выпадает примерно 80 % годовой нормы осадков. В самые жаркие месяцы средняя максимальная температура воздуха в северных районах достигает 31–32 °С. Поскольку разница средних максимальных и средних минимальных температур составляет 14–16 °С, климат Северного района нельзя назвать тропическим, но в то же время почвы, растительность и животный мир соответствуют тропикам. В Северном районе сохранились участки первичных тропических лесов, в которых деревья достигают высоты 50–55 м [5].

Климат Центрального Вьетнама характеризуется тем, что изменения влажности воздуха и количества осадков смещаются по месяцам по сравнению с северным климатическим районом, т.е. максимальные значения влажности и осадков сдвинуты к концу года, а в начале года наступает сухой сезон. В центральной части СРВ зимой дневные температуры колеблются от 21 до 24 °С, ночные – от 15 до 18 °С. Самый холодный месяц – январь. В течение лета температура воздуха остается практически неизменной – от 34 °С днем и до 25 °С ночью. По характеру увлажнения в этом регионе выделяется особая область прибрежных низменностей. Они защищены от юго-западного муссона горами Чыонгшон, поэтому максимум осадков приходится не на летние месяцы, как в остальных районах, а на осенние.

В Южном Вьетнаме климат субэкваториальный. Погода в этой части страны круглый год относительно стабильная (температура – от 29 до 35 °С летом и от 22 до 27 °С зимой). Весной и осенью погода также бывает достаточно неустойчива, а в период с середины октября до конца декабря на побережье обрушиваются тайфуны [6].

По данным за декабрь 2021 г., число жителей СРВ составляет около 98 млн человек. Большая часть людей проживает в крупных городах, таких как Ханой и Хошимин, и в южной части страны. Горная территория почти не занята [7].

Вирусы денге. Самой значимой арбовирусной инфекционной болезнью в СРВ является лихорадка денге за счет своей распространенности и большого количества случаев заболевания [8]. Основными переносчиками вирусов денге являются синантропные комары рода *Aedes*. Не исключается возможность заражения путем вертикальной передачи, особенно в случаях недоношенных беременностей [9], в процессе трансплантации органов [10], во время проведения медицинских манипуляций [11], а также при переливании крови или ее компонентов [12]. Возбудители лихорадки денге – вирусы денге 1–4-го



Условное разделение территории СРВ по климатическим признакам

Conditional division of the SRV territory according to climatic characteristics

(Dengue virus 1–4, DENV-1-4) типов, различающихся по своим антигенным и генетическим свойствам, относятся к семейству *Flaviviridae*, роду *Flavivirus*, к антигенному комплексу вирусов денге [8, 13]. Сравнительно недавно описан предположительно новый тип вируса – денге 5 (DENV-5), но официальных сведений по таксономии данного возбудителя в настоящее время нет [14]. Вирусы денге содержат односпиральную, позитивную, линейную РНК и покрыты двухслойной мембраной, состоящей из фосфолипидов и холестерина. Размеры сферического вириона колеблются в пределах 40–50 нм в диаметре. В состав вириона входят три структурных белка: капсидный протеин С, мажорный оболочечный протеин Е и либо рМ (у незрелых вирионов), либо М (у зрелых вирионов). В инфицированных клетках синтезируются семь неструктурных протеинов: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5 [15].

Распространение вируса поддерживают два варианта жизненного цикла. Один из них включает передачу вируса от комаров рода *Aedes* к человеку, а второй включает приматов, не относящихся к отряду человекообразных [16].

По данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируются более 60 млн случаев заболевания лихорадкой денге, из которых более 20 тыс. заканчиваются смертельным исходом. За последние десятилетия наблюдается расширение ареала распространения вирусов денге на новые территории. В настоящее время случаи инфицирования вирусами денге зафиксированы в 124 странах, а заболеваемость в последние годы возросла практически в 30 раз [1]. Независимо от серотипа, вирусы денге могут вызывать заболевание в различной форме, начиная с легкого неспецифического течения и заканчивая классической лихорадкой денге, включая геморрагическую лихорадку денге (ГЛД) и шоковый синдром денге с летальным исходом [17]. Тяжелые формы составляют до 5 % от всех зарегистрированных случаев заболевания, встречаются преимущественно у маленьких детей и пожилых людей, а также у пациентов с тяжелыми соматическими заболеваниями (сахарным диабетом, гипертонией, почечной недостаточностью и др.) [18].

В СРВ случаи заболевания, вызванные вирусами денге, были впервые выявлены в 60-х гг. прошлого столетия в районе дельты реки Меконг на юге страны [19]. В период с 1963 по 1995 год во Вьетнаме было зарегистрировано более 1,5 млн случаев ГЛД и более 14 тыс. летальных исходов. Есть данные о выявлении заболеваний у американских солдат [20].

По результатам многолетних наблюдений было показано, что заболеваемость в Южном Вьетнаме превышает таковую в северных районах. Южный регион Вьетнама известен как гиперэндемичный по лихорадке денге район, где тропический климат создает благоприятные условия для размножения переносчиков инфекции. Здесь случаи лихорадки

денге регистрируются круглый год, заметный сезонный пик приходится на дождливые месяцы, с июня по декабрь, и за последние годы количество заболеваний продолжает увеличиваться. Данные эпидемиологического надзора за лихорадкой денге в этом регионе указывают на возрастание числа случаев заболевания примерно каждые пять лет в период с 1975 по 1987 год, с более длительным перерывом, предшествующим крупной эпидемии в 1998 г., в которой зарегистрировано почти 120 тыс. случаев ГЛД с 342 летальными исходами. Интересно, что число заболеваний и смерти от ГЛД во время эпидемии 1998 г. увеличилось в полтора раза по сравнению с 1997 г., и преобладающим инфекционным агентом был определен вирус денге 3-го типа [21]. При этом анализ ежемесячной статистики по заболеваемости лихорадкой денге в Хошимине и соседних сельских провинциях юга Вьетнама позволил определить, что городское население болело реже, чем сельское, а ежегодные вспышки в данном регионе начинались на три месяца позже, чем в других районах СРВ [22].

Столица Вьетнама – Ханой – регион на севере страны с субтропическим климатом, с четкими сезонами и прохладной зимой. Хотя в Ханое ежегодно происходят сезонные вспышки лихорадки денге, между сезонами передача вируса незначительна или вообще не фиксируется. Говоря о последующих годах, необходимо отметить события 2017 г., когда случаи лихорадки денге были зафиксированы по всей территории СРВ, с большим числом заболевших, чем ранее. В это время даже на севере страны, в Ханое, было зарегистрировано более 37 тыс. случаев заболевания, в том числе 7 – со смертельным исходом [23].

Высокий уровень заболеваемости лихорадкой денге продолжает оставаться проблемой для здравоохранения СРВ и в последние годы. Так, в 2019 г., когда в мире было зарегистрировано наибольшее количество случаев данного инфекционного заболевания с момента начала наблюдений, число инфицированных лиц во Вьетнаме превышало 320 тыс. [1].

Следует отметить, что в большинстве вспышек лихорадки денге, зарегистрированных в последние десятилетия в СРВ, одновременно принимали участие все четыре типа вируса. В ряде исследований показано, что возбудители импортируются из южных регионов в провинции Центрального и Северного Вьетнама [22]. При изучении иммунной прослойки населения СРВ к вирусам денге выявлена существенная разница между отдельными регионами страны. Так, в северных районах ее уровень составлял от 11,2 до 37 % в разные годы, в южных – от 53 до 88,2 %. Процесс урбанизации способствует увеличению риска инфицирования, и в настоящее время циркуляция вирусов денге 1–4-го типов регистрируется как в городских, так и в сельских районах [24].

Вирус японского энцефалита. Японский энцефалит (ЯЭ) является одним из самых распространенных вирусных энцефалитов в мире, особенно в

странах Азии [25]. Около 75 % всех случаев заболевания приходится на детей в возрасте до 14 лет [26]. Возбудитель японского энцефалита – вирус японского энцефалита (ВЯЭ, Japanese encephalitis virus, JEV), относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* [13].

Структура генома ВЯЭ схожа с вирусами денге и представлена одноцепочечной позитивной РНК, транслирующейся как полипротеин, который расщепляется вирусными и клеточными протеазами на 3 структурных и 7 неструктурных белков.

Клинические симптомы ЯЭ разнообразны. Заболевание может проявляться только в виде повышения температуры и головной боли, но при развитии тяжелых клинических признаков в 20–30 % случаев наступает летальный исход, а у 30–50 % лиц, перенесших инфекцию, могут развиваться серьезные неврологические или психические расстройства [27].

На территории СРВ случаи ЯЭ впервые были выявлены в 1951 г. Самый высокий уровень заболеваемости был отмечен в 60-х гг. прошлого столетия и составлял 22 человека на 100 тыс. населения, а с 1985 по 1993 год колебался от 1 до 8 случаев [27]. В период с 1998 по 2007 год во Вьетнаме было зарегистрировано 19354 случая заболевания, включая 741 со смертельным исходом (3,8 %) [28]. Таким образом, до 2003 г. ЯЭ был распространен по всей территории СРВ с ежегодной заболеваемостью до 3 тыс. случаев, в основном в сельской местности [29, 30]. После внедрения в стране программы по контролю и профилактике данной инфекционной болезни количество заболеваний ЯЭ значительно снизилось. Но циркуляция ВЯЭ в стране не прекращается и регистрируется наравне с вирусами денге, хотя с гораздо меньшей интенсивностью [31].

Вирус Зика. Вирус Зика (Zika virus, ZIKV) является еще одним представителем семейства *Flaviviridae* [13], передается через укусы комаров и, как вирусы денге, имеет два варианта жизненного цикла, один из которых включает человека, а второй осуществляется силъватическим путем [32]. Лихорадка Зика – заболевание, длящееся от 2 до 7 дней, симптоматически схожее с лихорадкой денге, но с более легким течением, включающим небольшой подъем температуры, сыпь, мышечные и суставные боли, признаки усталости [33]. Доказано, что передача вируса Зика осуществляется не только трансмиссивным, но также перинатальным, половым путем, а также посредством гемотрансфузии. Наиболее серьезным клиническим осложнением после перенесенной лихорадки Зика является врожденная микроцефалия плода, развивающаяся при инфицировании матери во время беременности [34].

Геном вируса Зика также представляет собой одноцепочечную РНК. В настоящее время выделено три генотипа вируса – западноафриканский (нигерийский кластер), восточноафриканский (прототипный кластер MR766) и азиатский [35].

Во Вьетнаме первые случаи заболеваний, вызванных вирусом Зика, были описаны в 2016 г. в городах Нячанг и Хошимин [36], а также подтверждены три случая инфицирования туристов, посещавших страну. Позже вирус ретроспективно был выявлен в образцах, полученных в 2013 г. от детей, проживающих в Хошимине и пригороде провинции Лонган (Южный Вьетнам). В 2016 г. вспышка лихорадки Зика (в общей сложности 212 случаев заражения) охватила около 10 населенных пунктов в СРВ, но уже в 2017 г. было зарегистрировано только 24 случая заболевания по всей стране. Во всех описанных вариантах установлено местное происхождение вируса и трансмиссивная его передача [37]. Исследование образцов пуповинной и периферической крови новорожденных из группы высокого риска в г. Нячанг показало, что у 2 % пациентов были выявлены специфические антитела класса IgM, а у 63 % – специфические антитела класса IgG к вирусу Зика, хотя явных симптомов не было ни у одного из пациентов [38]. В 2019 г. на юге Вьетнама, преимущественно в г. Хошимине, зафиксировано 265 случаев заболевания, вызванного вирусом Зика [39].

Вирус чикунгунья. Вирус чикунгунья (*Chikungunya virus*, CHIKV) относится к семейству *Togaviridae* рода *Alphavirus* [13], вирусный геном также представляет собой одноцепочечную РНК позитивной полярности протяженностью около 11 тыс. нуклеотидов. В настоящее время вирус подразделяют на три генотипа: азиатский, западноафриканский и восточно-центрально-южноафриканский [40].

Возбудитель передается человеку трансмиссивным путем от комаров рода *Aedes*. Клинические признаки заболевания схожи с таковыми при лихорадке денге, особенно в первые несколько дней от начала болезни, включая, помимо прочего, общее недомогание, лихорадку, макуло-папулезную сыпь, головную, суставную и мышечные боли, что диктует необходимость проведения дифференциальной диагностики с лихорадками Зика и денге с использованием лабораторных методов. Также велика вероятность бессимптомного развития инфекционного процесса, которая, по данным разных авторов, может составлять от 3 до 82 % от общего количества заболеваний. Постинфекционный иммунитет после лихорадки чикунгунья может сохраняться на протяжении всей жизни, защищая от повторного заражения в течение длительного времени [41].

Впервые случаи заболеваний, вызванных вирусом чикунгунья, были описаны в СРВ в 2016 г. Исследования образцов сывороток крови жителей центральных и южных областей Вьетнама позволили выявить низкий уровень специфических антител класса IgG к возбудителю среди лиц до 30 лет и более высокий – в старшей возрастной группе. Полученные результаты показывают, что в последние годы уровень передачи патогена был достаточно низким, но и в предыдущие десятилетия с вирусом чикунгунья контактировало не более 2–4 % населения страны [42].

Описанные выше особенности арбовирусов, такие как способность ВЯЭ и вирусов денге вызывать тяжелые неврологические и геморрагические проявления, возможность развития врожденных дефектов при инфицировании вирусом Зика во время беременности, артрит и когнитивные расстройства, связанные с вирусом чикунгунья, вызывают тревогу в отношении потенциальных последствий одновременного инфицирования, которое может наблюдаться на всех эндемичных территориях, где выявлена циркуляция данных патогенов.

Одновременная циркуляция данного спектра арбовирусов (вирусы денге, Зика, чикунгунья и ЯЭ) была зарегистрирована в большинстве эндемичных регионов мира [43]. Поэтому нет ничего удивительного в возникновении коинфекции и на территории СРВ. Несмотря на то, что сообщения о возможности одновременного инфицирования несколькими арбовирусами достаточно многочисленны и их число продолжает возрастать, количество официально зарегистрированных случаев пока невелико.

Четких сведений о том, как влияет коинфекция на клинические проявления заболевания, все еще недостаточно и, по всей видимости, это зависит от конкретных случаев и возможной комбинации патогенов [44]. Попадая одновременно в организм человека, арбовирусы могут проявлять себя по-разному: никак не влияя один на другого; ингибировать или усиливать влияние друг друга; конкурировать между собой, и ни один из перечисленных вариантов не исключает развитие другого. Кроме того, исход заболевания, вызванного одновременным инфицированием несколькими видами патогенов, может еще зависеть от целого ряда других факторов, в том числе: пациенты инфицированы одновременно одним и тем же комаром или последовательно несколькими переносчиками; есть ли в крови больного специфические антитела к данным видам возбудителей; имелись ли сопутствующие или хронические заболевания. Так, например, во Вьетнаме среди пациентов с признаками острого энцефалита у 6,7 % лиц были выявлены антитела класса IgM к ВЯЭ, у 5,6 % – к вирусам денге, а у 33,3 % обнаружили иммуноглобулины класса М к обоим вирусам одновременно, но существенных различий в клинических проявлениях выявить не удалось [45]. Проведенные серологические исследования у детей в возрасте от 1 года до 10 лет в г. Нячанг показали, что из 80 образцов в 21,3 % выявлены специфические антитела класса IgG к ВЯЭ, в 87,5 % – к вирусам денге, а в 17,5 % проб – к этим двум патогенам одновременно [31]. В то же время отсутствие патогномичных признаков для каждой отдельно взятой арбовирусной инфекционной болезни на фоне массового распространения вирусов денге 1–4-го типов в СРВ может привести к сокращению выявления случаев инфицирования другими возбудителями, а также коинфекции.

Вирус Даби. В 2009 г. на территории КНР выявлены случаи заболевания тяжелой лихорадкой с

синдромом тромбоцитопении SFTS (Severe fever with thrombocytopenia syndrome), с летальностью от 16,2 до 30 %, которая характеризовалась повышением температуры, тромбоцитопенией, лейкопенией, высоким уровнем сывороточных ферментов печени, желудочно-кишечными симптомами и полиорганной недостаточностью. Также были доказаны и бессимптомные случаи болезни. В 2011 г. удалось выделить возбудитель и установить, что заболевание вызвано ранее неизвестным вирусом тяжелой лихорадки с синдромом тромбоцитопении (Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV), который в последующем был переименован в вирус Даби (Dabie bandavirus, DBV; former SFTS virus, SFTSV) и отнесен к роду *Bandavirus* (семейство *Phenuiviridae*, отряд *Bunyavirales*) [13, 46]. В последующих исследованиях показано, что большинство случаев инфицирования людей связаны с иксодовыми клещами видов *Haemaphysalis longicornis*, *Amblyomma testudinarium* и *Ixodes nipponensis*, которые широко распространены на территории стран Азии. Также была доказана и передача вируса при тесном контакте с больным человеком, и возможность инфицирования персонала больниц при совершении медицинских манипуляций. В 2011 г. циркуляция вируса Даби выявлена в Южной Корее, а 2013 г. – в западных регионах Японии [47].

В 2017–2018 гг. с целью изучения возможности распространения вируса Даби во Вьетнаме собраны сыворотки крови от 80 пациентов с острым лихорадочным синдромом, поступивших в университетскую больницу г. Хюэ (Центральный Вьетнам). В результате в двух образцах, полученных от двух больных с признаками тромбоцитопении, с использованием молекулярно-генетических методов выявлена РНК возбудителя. Наличие в пробах вируса Даби подтверждено последующим филогенетическим анализом S-сегмента. Также в сыворотке крови одного из больных людей обнаружены специфические антитела класса IgM к вирусу. Оба пациента ранее не посещали Китай, Южную Корею или Японию, что исключает возможность завоза из регионов, эндемичных по данной инфекционной болезни. Переносчики возбудителя тяжелой лихорадки с синдромом тромбоцитопении – клещи видов *H. longicornis*, *A. testudinarium* и *I. nipponensis* – часто встречаются на территории СРВ [48].

Отдельную тему для дискуссий, в которых участвуют ученые со всего мира, представляет отсутствие циркуляции на территории стран тропической Азии, в том числе и СРВ, вирусов желтой лихорадки и Западного Нила. Несмотря на идеальные экологические и эпидемиологические условия для распространения данных возбудителей (подходящий климат, большое количество людей, проживающих на данной территории, наличие соответствующих видов комаров – переносчиков инфекции, регулярно регистрирующиеся завозные случаи лихорадок), факт передачи возбудителей желтой лихорадки и

лихорадки Западного Нила никогда не был официально зарегистрирован в Азиатско-Тихоокеанском регионе [49].

Таким образом, природно-климатические, экологические, эпидемиологические и демографические условия, существующие в настоящее время на территории СРВ, способствуют распространению многих арбовирусов. При анализе имеющихся данных показано, что в южных и центральных районах Вьетнама циркуляция происходит более активно, чем в северных, и чаще всего занос инфекции осуществляется с юга страны на север (рисунок).

Все представленные в статье сведения дают основания для проведения ежегодного эпидемиологического и эпизоотологического обследования территории страны с целью выявления маркеров возбудителей и определения границ природных очагов арбовирусных инфекционных болезней, что позволит более детально проводить противоэпидемические и профилактические мероприятия с целью сокращения числа заболеваний инфекционными болезнями, вызванными арбовирусами, на территории Социалистической Республики Вьетнам.

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

Список литературы

1. WHO – Dengue and Severe Dengue. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (дата обращения 20.11.2021).
2. Younger D.S. Epidemiology of Zika Virus. *Neurol. Clin.* 2016; 34(4):1049–56. DOI: 10.1016/j.ncl.2016.06.008.
3. Nguyen-Tien T., Lundkvist A., Lindahl J. Urban transmission of mosquito-borne flaviviruses – a review of the risk for humans in Vietnam. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 2019; 9(1):1660129. DOI: 10.1080/20088686.2019.1660129.
4. WHO – Japanese encephalitis. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/japanese-encephalitis> (дата обращения 20.11.2021).
5. Тригубенко М.Е., Аносова Л.А., Хо К.В. Вьетнам. Справочник / Рос. АН, Ин-т междунар. экон. и полит. исслед. М.: Наука; 1993. 140 с.
6. Country factsheets. Viet Nam. 2020. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/vietnam> (дата обращения 20.11.2021).
7. Население Вьетнама. [Электронный ресурс]. URL: <https://countrymeters.info/ru/Vietnam> (дата обращения 20.11.2021).
8. Thai K.T.D., Nagelkerke N., Phuong H.L., Nga T.T.T., Giao P.T., Hung L.Q., Binh T.Q., Nam N.V., De Vries P.J. Geographical heterogeneity of dengue transmission in two villages in southern Vietnam. *Epidemiol. Infect.* 2010; 138(4):585–91. DOI: 10.1017/S095026880999046X.
9. Pouliot S.H., Xiong X., Harville E., Paz-Soldan V., Tomashek K.M., Breart G., Buckens P. Maternal dengue and pregnancy outcomes: a systematic review. *Obstet. Gynecol. Surv.* 2010; 65(2):107–18. DOI: 10.1097/OGX.0b013e3181cb8fbc.
10. Tan F.L., Loh D.L., Prabhakaran K., Tambyah P.A., Yap H.K. Dengue haemorrhagic fever after living donor renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005; 20(2):447–8. DOI: 10.1093/ndt/ghf601.
11. Chen L.H., Wilson M.E. Nosocomial dengue by mucocutaneous transmission. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(5):775. DOI: 10.3201/eid1105.040934.
12. Stramer S.L., Hollinger F.B., Katz L.M., Kleinman S., Metzler P.S., Gregory K.R., Dodd R.Y. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion.* 2009; Suppl. 2:1S–29S. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02279.x.
13. Taxonomic Information. [Электронный ресурс]. URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy> (дата обращения 20.11.2021).
14. Mustafa M.S., Rasotgi V., Jain S., Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med. J. Armed. Forces India.* 2015; 71(1):67–70. DOI: 10.1016/j.mjafi.2014.09.011.
15. Khetarpal N., Khanna I. Dengue fever: causes, complications, and vaccine strategies. *J. Immunol. Res.* 2016; 2016:6803098. DOI: 10.1155/2016/6803098.
16. Vasilakis N., Cardosa J., Hanley K.A., Holmes E.C., Weaver S.C. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9(7):532–41. DOI: 10.1038/nrmicro2595.
17. Gubler D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11(3):480–96. DOI: 10.1128/CMR.11.3.480.
18. Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science.* 2013; 342(6157):415. DOI: 10.1126/science.342.6157.415.
19. 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(5):819–30. DOI: 10.4269/ajtmh.1965.14.819.
20. Halstead S.B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Gubler D.J., Kuno G., editors. Oxon, UK: CABI Publishing; 1997.
21. Anders K.L., Nguyet N.M., Chau N.V., Hung N.T., Thuy T.T., Lien le B., Farrar J., Wills B., Hien T.T., Simmons C.P. Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 84:127–34. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.10.0476.
22. Cuong H.Q., Vu N.T., Cazelles B., Boni M.F., Thai K.T., Rabaa M.A., Quang L.C., Simmons C.P., Huu T.N., Anders K.L. Spatiotemporal dynamics of dengue epidemics, Southern Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(6):945–53. DOI: 10.3201/eid1906.121323.
23. Hanoi Preventive Medicine Center. Report on communicable disease control in Hanoi in 2017. Communicable disease control Department, Hanoi Preventive Medicine Center, Hanoi; 2017.
24. Schmidt W.P., Suzuki M., Thiem V.D., White R.G., Tsuzuki A., Yoshida L.M., Yanai H., Haque U., Tho le H., Anh D.D., Ariyoshi K. Population density, water supply, and the risk of dengue fever in Vietnam: Cohort study and spatial analysis. *PLOS Med.* 2011; 8(8):e1001082. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001082.
25. Wang H., Liang G. Epidemiology of Japanese encephalitis: past, present, and future prospects. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2015; 11:435–48. DOI: 10.2147/TCRM.S51168.
26. Tan F.L., Loh D.L., Prabhakaran K., Tambyah P.A., Yap H.K. Dengue haemorrhagic fever after living donor renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005; 20(2):447–8. DOI: 10.1093/ndt/ghf601.
27. Yen N.T., Duffy M.R., Hong N.M., Hien N.T., Fischer M., Hills S.L. Surveillance for Japanese encephalitis in Vietnam, 1998–2007. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 83(4):816–9. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.10.0262.
28. Tam N.H., Yen N.T. Japanese encephalitis in Vietnam 1985–1993. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 1995; 26(Suppl 3):47–50.
29. Erlanger T.E., Weiss S., Keiser J., Utzinger J., Wiedemayer K. Past, present, and future of Japanese encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(1):1–7. DOI: 10.3201/eid1501.080311.
30. Kuwata R., Nga P.T., Yen N.T., Hoshino K., Isawa H., Higa Y., Hoang N.V., Trang B.M., Loan do P., Phong T.V., Sasaki T., Tsuda Y., Kobayashi M., Sawabe K., Takagi M. Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in mosquitoes in Vietnam from 2006 to 2008. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013; 88(4):681–8. DOI: 10.4269/ajtmh.12-0407.
31. Quyen D.L., Thanh Le N., Van Anh C.T., Nguyen N.B., Hoang D.V., Montgomery J.L., Kutcher S.C., Hoang Le N., Hien N.T., Hue Kien D.T., Rabaa M., O'Neill S.L., Simmons C.P., Anh D.T., Anders K.L. Epidemiological, serological, and virological features of dengue in Nha Trang City, Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 98(2):402–9. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0630.
32. Weaver S.C., Costa F., Garcia-Blanco M.A., Ko A.I., Ribeiro G.S., Saade G., Shi P.Y., Vasilakis N. Zika virus: history, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res.* 2016; 130:69–80. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.03.010.
33. Hamel R., Liégeois F., Wichit S., Pompon J., Diop F., Talagnani L., Thomas F., Desprès P., Yssel H., Missé D. Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. *Microbes Infect.* 2016; 18(7-8):441–9. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.03.009.
34. Zanluca C., Dos Santos C.N. Zika virus – an overview. *Microbes Infect.* 2016; 18(5):295–301. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.03.003.
35. Musso D., Cao-Lormeau V.M., Gubler D.J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *Lancet.* 2015; 386(9990):243–4. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)61273-9.
36. WHO – Zika virus infection. Viet Nam. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.who.int/csr/don/12-april-2016-zika-vietnam/en/2016> (дата обращения 25.10.2020).
37. Chu D.T., Ngoc V.T.N., Tao Y. Zika virus infection in Vietnam: current epidemic, strain origin, spreading risk, and perspective. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2017; 36(11):2041–2. DOI: 10.1007/s10096-017-3030-8.

38. Tun M.M., Moriuchi M., Toizumi M., Luvai E., Raini S., Kitamura N., Takegata M., Nguyen H.T., Moi M.L., Buerano C.C., Anh D.D., Yoshida L.M., Morita K., Moriuchi H. Congenital Zika virus infection in a birth cohort in Vietnam, 2017–2018. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2020; 103(5):2059–64. DOI: 10.4269/ajtmh.20-0286.
39. Nguyen C.T., Moi M.L., Le T.Q.M., Nguyen T.T.T., Vu T.B.H., Nguyen H.T., Pham T.T.H., Le T.H.T., Nguyen L.M.H., Phu Ly M.H., Ng C.F.S., Takemura T., Morita K., Hasebe F. Prevalence of Zika virus neutralizing antibodies in healthy adults in Vietnam during and after the Zika virus epidemic season: a longitudinal population-based survey. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1):332. DOI: 10.1186/s12879-020-05042-2.
40. Khan A.H., Morita K., Parquet M.D.C., Hasebe F., Mathenge E.G., Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J. Gen. Virol.* 2002; 83(Pt 12):3075–84. DOI: 10.1099/0022-1317-83-12-3075.
41. CDC – Zika Virus. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cdc.gov/zika/> (дата обращения 20.11.2021).
42. Quan T.M., Phuong H.T., Vy N.H.T., Thanh N.T.L., Lien N.T.N., Hong T.T.K., Dung P.N., Chau N.V.V., Boni M.F., Clapham H.E. Evidence of previous but not current transmission of chikungunya virus in southern and central Vietnam: Results from a systematic review and a seroprevalence study in four locations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(2):e0006246. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006246.
43. Mercado-Reyes M., Acosta-Reyes J., Navarro-Lechuga E., Corchuelo S., Rico A., Parra E., Tolosa N., Pardo L., González M., Martín-Rodríguez-Hernández J., Karime-Osorio L., Ospina-Martínez M., Rodríguez-Perea H., Del Río-Pertuz G., Viasus D. Dengue, chikungunya and zika virus coinfection: results of the national surveillance during the zika epidemic in Colombia. *Epidemiol. Infect.* 2019; 147:e77. DOI: 10.1017/S095026881800359X.
44. Останкова Ю.В., Найденова Е.В., Серикова Е.Н., Шемелев А.Н., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Хуйнх Х., Семенов А.В. К вопросу о коинфицировании 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.
45. Ngwe Tun M.M., V. Muthugala R., Thi Thu Thuy N., Hoai Linh Ly P., Thi Hien Thu L., Thi Dinh D., Viet Hoang N., Thi Quynh Mai L., Moi M.L., Buerano C.C., Morita K., Hasebe F. Dengue associated acute encephalitis syndrome cases in Son La Province, Vietnam in 2014. *Jpn J. Infect. Dis.* 2017; 70(4):357–61. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2016.246.
46. Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Боярская Н.В., Борисевич С.В. Диагностика острой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом – болезни, вызываемой новым флeбoвиpуcом. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016; 3:21–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-21-26.
47. Li J., Li S., Yang L., Cao P., Lu J. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: a highly lethal bunyavirus. *Crit. Rev. Microbiol.* 2021; 47(1):112–25. DOI: 10.1080/1040841X.2020.1847037.
48. Tran X.C., Yun Y., Van An L., Kim S.H., Thao N.T.P., Man P.K.C., Yoo J.R., Heo S.T., Cho N.H., Lee K.H. Endemic severe fever with thrombocytopenia syndrome, Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(5):1029–31. DOI: 10.3201/eid2505.181463.
49. Kuno G. The absence of yellow fever in Asia: history, hypotheses, vector dispersal, possibility of YF in Asia, and other enigmas. *Viruses.* 2020; 12(12):1349. DOI: 10.3390/v12121349.
9. Pouliot S.H., Xiong X., Harville E., Paz-Soldan V., Tomashek K.M., Breart G., Buekens P. Maternal dengue and pregnancy outcomes: a systematic review. *Obstet. Gynecol. Surv.* 2010; 65(2):107–18. DOI: 10.1097/OGX.0b013e3181cb88fb.
10. Tan F.L., Loh D.L., Prabhakaran K., Tambyah P.A., Yap H.K. Dengue haemorrhagic fever after living donor renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005; 20(2):447–8. DOI: 10.1093/ndt/gfh601.
11. Chen L.H., Wilson M.E. Nosocomial dengue by mucocutaneous transmission. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(5):775. DOI: 10.3201/eid1105.040934.
12. Stramer S.L., Hollinger F.B., Katz L.M., Kleinman S., Metzler P.S., Gregory K.R., Dodd R.Y. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion.* 2009; Suppl. 2:1S–29S. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02279.x.
13. Taxonomic Information. (Cited 20 Nov 2021). [Internet]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>.
14. Mustafa M.S., Rasotgi V., Jain S., Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med. J. Armed. Forces India.* 2015; 71(1):67–70. DOI: 10.1016/j.mjafi.2014.09.011.
15. Khetarpal N., Khanna I. Dengue fever: causes, complications, and vaccine strategies. *J. Immunol. Res.* 2016; 2016:6803098. DOI: 10.1155/2016/6803098.
16. Vasilakis N., Cardoso J., Hanley K.A., Holmes E.C., Weaver S.C. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9(7):532–41. DOI: 10.1038/nrmicro2595.
17. Gubler D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11(3):480–96. DOI: 10.1128/CMR.11.3.480.
18. Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science.* 2013; 342(6157):415. DOI: 10.1126/science.342.6157.415.
19. 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(5):819–30. DOI: 10.4269/ajtmh.1965.14.819.
20. Halstead S.B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Gubler D.J., Kuno G., editors. Oxon, UK: CABI Publishing; 1997.
21. Anders K.L., Nguyet N.M., Chau N.V., Hung N.T., Thuy T.T., Lien le B., Farrar J., Wills B., Hien T.T., Simmons C.P. Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 84:127–34. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.10-0476.
22. Cuong H.Q., Vu N.T., Cazelles B., Boni M.F., Thai K.T., Rabaa M.A., Quang L.C., Simmons C.P., Huu T.N., Anders K.L. Spatiotemporal dynamics of dengue epidemics, Southern Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(6):945–53. DOI: 10.3201/eid1906.121323.
23. Hanoi Preventive Medicine Center. Report on communicable disease control in Hanoi in 2017. Communicable disease control Department, Hanoi Preventive Medicine Center, Hanoi; 2017.
24. Schmidt W.P., Suzuki M., Thiem V.D., White R.G., Tsuzuki A., Yoshida L.M., Yanai H., Haque U., Tho le H., Anh D.D., Ariyoshi K. Population density, water supply, and the risk of dengue fever in Vietnam: Cohort study and spatial analysis. *PLOS Med.* 2011; 8(8):e1001082. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001082.
25. Wang H., Liang G. Epidemiology of Japanese encephalitis: past, present, and future prospects. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2015; 11:435–48. DOI: 10.2147/TCRM.S51168.
26. Tan F.L., Loh D.L., Prabhakaran K., Tambyah P.A., Yap H.K. Dengue haemorrhagic fever after living donor renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005; 20(2):447–8. DOI: 10.1093/ndt/gfh601.
27. Yen N.T., Duffy M.R., Hong N.M., Hien N.T., Fischer M., Hills S.L. Surveillance for Japanese encephalitis in Vietnam, 1998–2007. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 83(4):816–9. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.10-0262.
28. Tam N.H., Yen N.T. Japanese encephalitis in Vietnam 1985–1993. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 1995; 26(Suppl 3):47–50.
29. Erlanger T.E., Weiss S., Keiser J., Utzinger J., Wiedemayer K. Past, present, and future of Japanese encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(1):1–7. DOI: 10.3201/eid1501.080311.
30. Kuwata R., Nga P.T., Yen N.T., Hoshino K., Isawa H., Higa Y., Hoang N.V., Trang B.M., Loan do P., Phong T.V., Sasaki T., Tsuda Y., Kobayashi M., Sawabe K., Takagi M. Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in mosquitoes in Vietnam from 2006 to 2008. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013; 88(4):681–8. DOI: 10.4269/ajtmh.12-0407.
31. Quyen D.L., Thanh Le N., Van Anh C.T., Nguyen N.B., Hoang D.V., Montgomery J.L., Kutcher S.C., Hoang Le N., Hien N.T., Hue Kien D.T., Rabaa M., O'Neill S.L., Simmons C.P., Anh D.D., Anders K.L. Epidemiological, serological, and virological features of dengue in Nha Trang City, Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 98(2):402–9. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0630.

References

1. WHO – Dengue and Severe Dengue. (Cited 20 Nov 2021). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
2. Younger D.S. Epidemiology of Zika Virus. *Neurol. Clin.* 2016; 34(4):1049–56. DOI: 10.1016/j.ncl.2016.06.008.
3. Nguyen-Tien T., Lundkvist Å., Lindahl J. Urban transmission of mosquito-borne flaviviruses – a review of the risk for humans in Vietnam. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 2019; 9(1):1660129. DOI: 10.1080/20008686.2019.1660129.
4. WHO – Japanese encephalitis. (Cited 20 Nov 2021). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/japanese-encephalitis>.
5. Trigubenko M.E., Anosova L.A., Ho K.V. [Vietnam. Directory / RAS, Institute of International Economic and Political Research]. Moscow: “Nauka”; 1993.140 p.
6. Country factsheets. Viet Nam. 2020. (Cited 20 Nov 2021). [Internet]. Available from: <https://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/vietnam>.
7. [Population of Vietnam]. (Cited 20 Nov 2021). [Internet]. Available from: <https://countymeters.info/ru/Vietnam>.
8. Thai K.T.D., Nagelkerke N., Phuong H.L., Nga T.T.T., Giao P.T., Hung L.Q., Binh T.Q., Nam N.V., De Vries P.J. Geographical heterogeneity of dengue transmission in two villages in southern Vietnam. *Epidemiol. Infect.* 2010; 138(4):585–91. DOI: 10.1017/S095026880999046X.

32. Weaver S.C., Costa F., Garcia-Blanco M.A., Ko A.I., Ribeiro G.S., Saade G., Shi P.Y., Vasilakis N. Zika virus: history, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res.* 2016; 130:69–80. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.03.010.
33. Hamel R., Liégeois F., Wichit S., Pompon J., Diop F., Talignani L., Thomas F., Desprès P., Yssel H., Missé D. Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. *Microbes Infect.* 2016; 18(7-8):441–9. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.03.009.
34. Zanluca C., Dos Santos C.N. Zika virus – an overview. *Microbes Infect.* 2016; 18(5):295–301. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.03.003.
35. Musso D., Cao-Lormeau V.M., Gubler D.J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *Lancet.* 2015; 386(9990):243–4. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)61273-9.
36. WHO – Zika virus infection. Viet Nam. (Cited 25 Oct 2020). [Internet]. Available from: <http://www.who.int/csr/don/12-april-2016-zika-viet-nam/en/2016>.
37. Chu D.T., Ngoc V.T.N., Tao Y. Zika virus infection in Vietnam: current epidemic, strain origin, spreading risk, and perspective. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2017; 36(11):2041–2. DOI: 10.1007/s10096-017-3030-8.
38. Tun M.M., Moriuchi M., Toizumi M., Luvai E., Raini S., Kitamura N., Takegata M., Nguyen H.T., Moi M.L., Buerano C.C., Anh D.D., Yoshida L.M., Morita K., Moriuchi H. Congenital Zika virus infection in a birth cohort in Vietnam, 2017–2018. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2020; 103(5):2059–64. DOI: 10.4269/ajtmh.20-0286.
39. Nguyen C.T., Moi M.L., Le T.Q.M., Nguyen T.T.T., Vu T.B.H., Nguyen H.T., Pham T.T.H., Le T.H.T., Nguyen L.M.H., Phu Ly M.H., Ng C.F.S., Takemura T., Morita K., Hasebe F. Prevalence of Zika virus neutralizing antibodies in healthy adults in Vietnam during and after the Zika virus epidemic season: a longitudinal population-based survey. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1):332. DOI: 10.1186/s12879-020-05042-2.
40. Khan A.H., Morita K., Parquet M.D.C., Hasebe F., Mathenge E.G., Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J. Gen. Virol.* 2002; 83(Pt 12):3075–84. DOI: 10.1099/0022-1317-83-12-3075.
41. CDC – Zika Virus. (Cited 20 Nov 2021). [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/zika>.
42. Quan T.M., Phuong H.T., Vy N.H.T., Thanh N.T.L., Lien N.T.N., Hong T.T.K., Dung P.N., Chau N.V.V., Boni M.F., Clapham H.E. Evidence of previous but not current transmission of chikungunya virus in southern and central Vietnam: Results from a systematic review and a seroprevalence study in four locations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(2):e0006246. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006246.
43. Mercado-Reyes M., Acosta-Reyes J., Navarro-Lechuga E., Corchuelo S., Rico A., Parra E., Tolosa N., Pardo L., González M., Martín-Rodríguez-Hernández J., Karime-Osorio L., Ospina-Martínez M., Rodríguez-Perea H., Del Río-Pertuz G., Viasus D. Dengue, chikungunya and Zika virus coinfection: results of the national surveillance during the Zika epidemic in Colombia. *Epidemiol. Infect.* 2019; 147:e77. DOI: 10.1017/S095026881800359X.
44. Ostankova Yu.V., Naidenova E.V., Serikova E.N., Schemelev A.N., Valutite D.E., Zueva E.B., Huinh H., Semenov A.V. [Regarding coinfection with dengue 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. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-6-12.
45. Ngwe Tun M.M., V. Muthugala R., Thi Thu Thuy N., Hoai Linh Ly P., Thi Hien Thu L., Thi Dinh D., Viet Hoang N., Thi Quynh Mai L., Moi M.L., Buerano C.C., Morita K., Hasebe F. Dengue associated acute encephalitis syndrome cases in Son La Province, Vietnam in 2014. *Jpn J. Infect. Dis.* 2017; 70(4):357–61. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2016.246.
46. Sizikova T.E., Lebedev V.N., Boyarskaya N.V., Borisevich S.V. [Diagnostics of severe fever with thrombocytopenia syndrome – disease, caused by novel phlebovirus]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (3):21–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-21-26.
47. Li J., Li S., Yang L., Cao P., Lu J. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: a highly lethal bunyavirus. *Crit. Rev. Microbiol.* 2021; 47(1):112–25. DOI: 10.1080/1040841X.2020.1847037.
48. Tran X.C., Yun Y., Van An L., Kim S.H., Thao N.T.P., Man P.K.C., Yoo J.R., Heo S.T., Cho N.H., Lee K.H. Endemic severe fever with thrombocytopenia syndrome, Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(5):1029–31. DOI: 10.3201/eid2505.181463.
49. Kuno G. The absence of yellow fever in Asia: history, hypotheses, vector dispersal, possibility of YF in Asia, and other enigmas. *Viruses.* 2020; 12(12):1349. DOI: 10.3390/v12121349.

Authors:

Kas'yan Zh.A., Naidenova E.V., Proskuryakova M.V., Mikheeva E.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Trinh Van Toan, Bui Thi Thanh Nga, Vo Viet Cuong. Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center. Hanoi, Socialist Republic of Vietnam.

Об авторах:

Касьян Ж.А., Найденова Е.В., Проскурякова М.В., Михеева Е.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Trinh Van Toan, Bui Thi Thanh Nga, Vo Viet Cuong. Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-35-45

УДК 616.9:616-07

О.Ф. Кретенчук

**ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДИАГНОСТИКИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ***ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация*

В настоящее время большое значение придается получению диагностических препаратов на основе специфических иммунореагентов, к которым относятся и моноклональные антитела, продуцируемые гибридомами. Использование моноклональных антител является одним из важных подходов для диагностики возбудителей особо опасных инфекций: сибирской язвы, бруцеллеза, туляремии, чумы, холеры, сапа и мелиоидоза. В обзоре приведены основные результаты российских ученых по получению таких экспериментальных препаратов, а также уделено внимание тем наборам моноклональных реагентов, которые допущены к обращению на территории Российской Федерации. На сегодняшний день в нашей стране на основе моноклональных антител зарегистрированы три набора реагентов для выявления возбудителя сибирской язвы (латекс-агглютинация, иммунохроматографический метод, мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ); четыре набора реагентов для определения возбудителя туляремии (латекс-агглютинация, иммунохроматографический метод, мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ, дот-вариант иммуноферментного анализа); три набора для детекции чумного микроба (иммуноферментный и иммунохроматографические тесты); пять наборов для обнаружения холерных вибрионов (слайд-агглютинация, иммунофлуоресценция, иммунохроматографический и иммуноферментный методы); два набора для диагностики сапа и мелиоидоза (иммунофлуоресценция); наборы для выявления бруцелл не зарегистрированы, существуют лишь единичные экспериментальные разработки. Привлечение в диагностику особо опасных инфекций современных препаратов на основе моноклональных антител позволит повысить качество и достоверность лабораторного анализа.

Ключевые слова: моноклональные антитела, набор реагентов, холера, чума, туляремия, сибирская язва, бруцеллез, сап, мелиоидоз.

Корреспондирующий автор: Кретенчук Оксана Федоровна, e-mail: plague@aanet.ru.

Для цитирования: Кретенчук О.Ф. Отечественные средства диагностики особо опасных инфекций на основе моноклональных антител. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:35–45. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-35-45

Поступила 28.05.2020. Отправлена на доработку 15.06.2020. Принята к публ. 22.01.2021.

O.F. Kretenchuk**Domestically-Produced Monoclonal-Antibody-Based Means of Diagnosing Particularly Dangerous Infections***Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation*

Abstract. Currently, great significance is attached to the preparation of diagnostic drugs based on specific immunoreagents, which include monoclonal antibodies produced by hybridomas. The use of monoclonal antibodies is one of the important approaches for the detection of pathogens of particularly dangerous infections – anthrax, brucellosis, tularemia, plague, cholera, glanders, and melioidosis. The review presents the main achievements of Russian scientists on obtaining such experimental drugs, and also pays attention to those sets of monoclonal reagents that are authorized in the Russian Federation. To date, three sets of reagents for detecting the causative agent of anthrax (latex agglutination, immunochromatographic method, multiplex immunofluorescence analysis) have been registered in our country on the basis of monoclonal antibodies; four sets of reagents for identifying the causative agent of tularemia (latex agglutination, immunochromatographic method, multiplex immunofluorescence analysis, dot-variant of enzyme immunoassay); three sets for the detection of plague microbe (enzyme immunoassay and immune chromatographic tests); five sets for cholera vibrios (slide agglutination, immunofluorescence, immune chromatographic method and enzyme immunoassay); two sets for the diagnosis of glanders and melioidosis (immunofluorescence); kits for detecting brucella have not been registered, there are only singular experimental designs. The involvement of modern drugs based on monoclonal antibodies in the diagnosis of particularly dangerous infections will improve the quality and reliability of laboratory analysis.

Key words: monoclonal antibodies, reagent panel, cholera, plague, tularemia, anthrax, brucellosis, glanders, and melioidosis.

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

Corresponding author: Oksana F. Kretenchuk, e-mail: plague@aanet.ru.

Citation: Kretenchuk O.F. Domestically-Produced Monoclonal-Antibody-Based Means of Diagnosing Particularly Dangerous Infections. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:35–45. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-35-45

Received 28.05.2020. Revised 15.06.2020. Accepted 22.01.2021.

Kretenchuk O.F., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5299-0243>

Моноклональные антитела (МКА) широко используются для решения различных научных и практических задач. Более 43 тыс. публикаций на сайте Научной электронной библиотеки elibrary.ru посвящены МКА, а основная часть работ – их применению в диагностике и терапии различных болезней. Эффективный метод получения МКА желаемой антигенной специфичности разработали еще в 1975 г. Георг Келер и Цезарь Мильштейн, что положило начало развитию гибридомной технологии. С тех пор метод гибридизации претерпел существенные изменения, но и сейчас используется многими лабораториями, несмотря на развитие в течение последних 15 лет технологии получения рекомбинантных антител [1]. Несомненным достоинством рекомбинантных технологий является то, что с их помощью можно не только получать аналоги уже существующих МКА путем разнообразных модификаций их биохимических и иммунохимических свойств, но и создавать новые, специфичные к различным антигенам [2]. На сегодняшний день можно выделить следующие типы МКА [3]: мышинные; химерные; гуманизированные; «полностью человеческие», полученные путем создания трансгенных мышей, которые производят антитела с «человеческой» первичной структурой антигенсвязывающего домена, или путем скрининга *in vitro* библиотек антител, отобранных из репертуара существующих или теоретически возможных человеческих антител (*in vitro* дисплей).

В настоящее время получение МКА из экзотики превратилось в один из стандартных промышленных процессов, что позволило создать технологическую платформу, унифицирующую их производство. Коммерческое производство МКА значительно увеличивает их стоимость, поэтому во многих лабораториях научно-исследовательских институтов до сих пор применяют именно гибридную технологию.

В последние годы наблюдается рост использования МКА в качестве диагностических и лекарственных препаратов при онкологических, воспалительных, кардиометаболических и инфекционных заболеваниях [4], в том числе и особо опасных инфекций (ООИ). Необходимо отметить, что многие методы и препараты на основе МКА так и остались на стадии экспериментальных разработок и недоступны в виде коммерческих диагностикумов. Учитывая это, отдельное внимание в обзоре будет уделено зарегистрированным в Росздравнадзоре наборам моноклональных реагентов.

МКА в диагностике сибирской язвы. Сибирская язва является особо опасной инфекционной болезнью животных и человека, вызываемой спорообразующим грамположительным микроорганизмом *Bacillus anthracis*. Разработка современных диагностических систем для детекции возбудителя сибирской язвы представляла и представляет собой одну из наиболее актуальных задач в борьбе с этой инфекцией. На сегодняшний день в нашей стране зарегистрированы три набора реагентов на основе МКА

производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ): «Набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы «ИХ тест-система *B. anthracis*» (ФСР 2009/05485), «Набор реагентов для определения спор *Bacillus anthracis* в реакции латекс-агглютинации» (ФСР 2011/12159) и «Набор реагентов для определения возбудителей сибирской язвы и туляремии методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа (Тест-система ИФЛА-2BF)» (РЗН 2014/1468). Разработать данные препараты удалось благодаря гибридоме-продуценту МКА к спорам *B. anthracis* (1Е6), полученной по общепринятой методике и депонированной в коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ под номером Н10 [5].

Иммунохроматографические (ИХ) тесты – портативные индикаторные полоски (стрипы), принцип действия которых состоит в том, что после погружения стрипа в раствор исследуемого материала, содержащего целевой антиген, происходит его связывание с первыми антителами, меченными коллоидным золотом. Коллоидное золото визуализирует образовавшиеся иммунные комплексы в виде полосы в тестовой зоне [6]. Зарегистрированная «ИХ тест-система *B. anthracis*» позволяет выявлять 10^8 – 10^9 спор/мл, что явилось основанием для дальнейшей работы по поиску более чувствительных методов. Так, сконструированный латексный диагностикум (ФСР 2011/12159) обеспечивает детекцию споровой формы возбудителя сибирской язвы в количестве $1 \cdot 10^5$ – $2 \cdot 10^6$ спор/мл [7]. Показано, что наибольшая чувствительность реакции агглютинации наблюдалась при нагрузке МКА на латексные частицы в количестве 20 мкг на 50 мкл. Учет результатов как в первом, так и во втором методе проводят визуально.

Заслуживают внимания и экспериментальные тест-системы: иммуноферментная (ИФА) и магнимоносорбентная (МИС) для выявления возбудителя сибирской язвы в споровой форме, которые успешно прошли комиссионные испытания, но не зарегистрированы в качестве медицинских изделий. Для создания этих тест-систем требовались не только МКА 1Е6 [5], но и 3G3, 6B6, причем важным моментом являлось их одномоментное использование в комбинациях, не конкурирующих за общие сайты связывания и не теряющих специфической активности при конъюгировании с ферментом или иной меткой [8]. Разработанные таким образом тест-системы выявляли споры штаммов возбудителя сибирской язвы в концентрации $1 \cdot 10^6$ спор/мл в случае «сэндвич»-ИФА и $1 \cdot 10^3$ спор/мл при использовании МИС.

Подобные исследования проведены и в филиале ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России (далее – филиал 48 ЦНИИ МО РФ) (г. Киров), в результате которых удалось вывести гибридные клеточные линии, продуцирующие специфические МКА к спорным анти-

генам *B. anthracis*, и на их основе разработать иммуноферментную тест-систему для выявления спор *B. anthracis* с пределом обнаружения $5,0 \cdot 10^5$ спор/мл. Показано отсутствие перекрестных реакций с близкородственными сапрофитами и гетерологичными микроорганизмами в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ м.к./мл [9].

Говоря об ИФА с моноклональными реагентами, хотелось бы отметить перспективность его использования и для обнаружения токсина *B. anthracis*, в частности протективного антигена (ПА). Так, еще в 2005 г. М.Г. Романов (ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов») в своей диссертационной работе подробно описал не только получение коллекции гибридом-продуцентов МКА к ПА *B. anthracis*, но и предложил «сэндвич»-ИФА (чувствительность 5–7 нг/мл) для дифференциации возбудителя сибирской язвы от других представителей рода *Bacillus* по принципу токсинообразования [10]. Сотрудники института биорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН к 2011 г. получили панель из 20 моноклональных антител к ПА сибирской язвы, центральному компоненту экзотоксина патогена, на основе которых разработали «сэндвич»-ИФА для количественного определения ПА (чувствительность 1 нг/мл) [11]. В ФБУН ГНЦ ПМБ (2013 г.) предложили более чувствительный (1 пг/мл) способ иммунофлуоресцентного определения протективного антигена *B. anthracis* на основе МКА, специфичных к различным эпитопам протективного антигена, одно из которых, специфичное к III домену ПА, иммобилизовано на твердой фазе и служит для связывания ПА, содержащегося в исследуемых пробах, а второе биотинилированное антитело, специфичное к IV домену, детектирует ПА за счет взаимодействия с тетравалентной молекулой нейтравида, конъюгированной с фикоэритрином, используемым для флуоресцентной детекции сигнала в режиме реального времени. Для проведения данного метода рекомендуется также использовать 96-луночные планшеты. Присутствие ПА в исследуемых образцах определяют по изменению уровня флуоресценции по сравнению с контролем [12]. Кроме того, специалисты ФБУН ГНЦ ПМБ разработали способ определения ПА [13] и летального фактора (ЛФ) сибирской язвы [14] на основе иммунодетекции, сопряженной с полимеразной цепной реакцией, благодаря которому в 2014 г. зарегистрированы два набора реагентов: «Тест-система ИПЦР-ПА» и «Тест-система ИПЦР-ЛФ». При конструировании данных тест-систем использовали пары МКА к различным эпитопам ПА (РЗН 2014/1464) и ЛФ (РЗН 2014/1470), что способствовало повышению чувствительности до 0,1 пМ.

В последние годы появились данные о получении и депонировании в ГКПМ-Оболensk тригибридной клеточной линии *H. sapiens/Mus musculus* с авторским названием 8D4E9-Ba-LF, продуцирующей человеческие МКА против летального фактора

возбудителя сибирской язвы [15]. Конечно, данные антитела не являются диагностическими, а эффективны для создания средств защиты человека от заражения или потенциального заражения сибирской язвой. Но работа вызывает интерес из-за метода получения гибридного штамма путем электрослияния в мультипораторе, эффективность которого, как правило, на один-два порядка выше, чем гибридизация химическим методом с использованием полиэтиленгликоля.

Таким образом, исследования по получению моноклональных препаратов, способных выявлять возбудителя сибирской язвы, продолжаются в направлении совершенствования методов и средств диагностики, опираясь на современные достижения в этой уникальной области. Кроме того, перспективным является и создание комплексных тест-систем для одновременного выявления двух и более возбудителей ООИ. Подобный набор реагентов зарегистрирован для определения возбудителей сибирской язвы и туляремии методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа (тест-система ИФЛА-2BF). Спектр таких препаратов необходимо расширять.

МКА в диагностике туляремии. Крупные вспышки и спорадические случаи туляремии периодически регистрируются во многих странах мира, в том числе и в России. Сохранение эпизоотически активных природных очагов, вероятность применения *Francisella tularensis* при биотеррористических актах, сложность постановки клинического диагноза обуславливают необходимость совершенствования лабораторной диагностики этой инфекции [16]. На сегодняшний день в нашей стране зарегистрированы четыре набора реагентов на основе МКА: три набора производства ФБУН ГНЦ ПМБ – для определения возбудителя туляремии в реакции латекс-агглютинации (ФСР 2011/12157), с помощью иммунохроматографической тест-системы (ФСР 2009/05486) и методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа (РЗН 2014/1468), а также тест-система «ДИАТул-М» (ФСР 2012/13944) производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», позволяющая выявлять *F. tularensis* в дот-варианте ИФА. Последний метод характеризуется экспрессностью, экономичностью в отношении расхода реагентов, простотой постановки и учета результатов. Базовыми иммунореагентами тест-системы «ДИАТул-М» являются МКА к основному диагностически значимому антигену *F. tularensis* – ЛПС, что обеспечивает специфичность и стандартность разработанного препарата и позволяет выявлять тулярийный микроб в биологическом материале от людей и животных, в объектах окружающей среды и чистых культурах в минимальной концентрации $1 \cdot 10^6$ – $5 \cdot 10^6$ м.к./мл при отрицательной реакции с гетерологичными бактериями [17, 18].

Для конструирования диагностикумов в ФБУН ГНЦ ПМБ использовались гибридомы, продуцирующие высокоспецифичные МКА к ЛПС *F. tularensis* и

депонированные в ГКПМ-Оболенск под номерами H11 (11D6), H42 (1D6) [19, 20]. Основным реагентом набора для определения возбудителя туляремии в реакции латекс-агглютинации (ФСР 2011/12157) являются МКА 11D6, сенсibilизированные с полиакролеиновыми латексными частицами диаметром 1 и 1,2 мкм (Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва). Данный метод позволяет выявлять клетки штаммов *F. tularensis* в концентрации $9 \cdot 10^4$ – $7,5 \cdot 10^5$ м.к./мл при отрицательной реакции с гетерологичными микроорганизмами в концентрации $2 \cdot 10^8$ м.к./мл. Говоря об ИХ-тест-системах, отметим не только эффективность метода, простоту постановки реакций, возможность получения результата в течение 15–20 мин, но и невысокую чувствительность – $1 \cdot 10^8$ – $1 \cdot 10^9$ м.к./мл. Возможность применения ИХ-тест-систем (ФСР 2009/05486), разработанных и изготовленных в ФБУН ГНЦ ПМБ для экспресс-выявления ЛПС туляремиального микроба, оценили в Ставропольском научно-исследовательском противочумном институте при проведении мониторинга природных очагов Северного Кавказа. Исследователи рекомендовали использовать данный метод для изучения проб с заведомо большой концентрацией антигена (10^9 м.к./мл) [21].

Остановимся и на некоторых экспериментальных препаратах. Так, в 48 ЦНИИ МО РФ осуществили подбор МКА (31G1F10, 32E5D3, 35B11C8, 36C2F11), обладающих иммунохимической активностью к антигенам *F. tularensis*, для выявления данного возбудителя в иммуноферментном и иммунохроматографическом методе. Оценка чувствительности и специфичности разработанных тест-систем показала, что образцы обеспечивали выявление штаммов *F. tularensis* в концентрации от $5,0 \cdot 10^5$ м.к./мл до $1,0 \cdot 10^6$ м.к./мл и не давали ложноположительных результатов при исследовании гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ м.к./мл [22, 23]. Такие иммуноферментные средства детекции возбудителя туляремии могли бы расширить набор диагностикумов, используемых в России, так как на сегодняшний день зарегистрированы только поликлональные иммуноферментные тест-системы производства Ставропольского противочумного института [24], причем в одной из тест-систем предложен эффективный метод селективного концентрирования возбудителя на магнитной матрице, повышающий чувствительность до 10^2 – 10^3 м.к. Применение магноиммуносорбентов может быть перспективным и в сочетании с МКА. Усилия разработчиков должны быть направлены не только на повышение порога чувствительности наборов реагентов и исключение неспецифических реакций, но и на упрощение процедуры постановки и учета реакции и доведение экспериментальных разработок до выпуска сертифицированного препарата [16].

МКА в диагностике бруцеллеза. На сегодняшний день в мире предложено много различных тестов

для диагностики бруцеллеза, но ни один из них не обладает оптимальной чувствительностью и специфичностью из-за ложноположительных реакций, которые обусловлены сходством строения гладкого липополисахаридного (s-ЛПС) антигена у грамотрицательных бактерий. Перекрестные реакции осложняют диагностику и могут препятствовать проведению программ по борьбе с бруцеллезом [25]. В настоящее время в Российской Федерации отсутствуют официально зарегистрированные и разрешенные к применению наборы реагентов на основе МКА для выявления бруцеллеза, а существуют лишь единичные экспериментальные разработки. В доступной нам литературе сведения об отечественных моноклональных препаратах для обнаружения бруцелл появились в 1990-е гг. Так, были получены и депонированы во Всесоюзной (ныне Всероссийской) специализированной коллекции перевиваемых клеточных культур (Санкт-Петербург) штаммы гибридом, вырабатывающие МКА против полисахаридных и белковых эпитопов бактерий рода *Brucella* [26] и являющиеся основой для создания высокоэффективных реагентов для диагностики возбудителя в биологическом материале методом ИФА, латекс-агглютинации. Для экспресс-обнаружения бруцеллезных антигенов в патологическом материале предложен эритроцитарный моноклональный диагностикум.

В Иркутском научно-исследовательском противочумном институте Сибири и Дальнего Востока к 1998 г. получена коллекция гибридом, синтезирующих МКА к антигенам *B. abortus* 19ВА, которые использовались для изучения антигенной структуры возбудителя бруцеллеза и разработки диагностических препаратов. На основе МКА 2АН10 сконструирована и испытана бруцеллезная латексная тест-система, усовершенствован ИФА для идентификации штаммов *B. abortus* и *B. suis* [27]. Модифицирован способ улучшения качества коммерческой эмбриональной телячьей сыворотки, являющейся одним из основных компонентов культуральных сред для выращивания клеток миеломных и гибридных линий.

В НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи создана высокоэффективная иммуноферментная тест-система на основе МКА против липополисахарида (ЛПС) *B. abortus*, с высокой чувствительностью (0,05–0,1 нг/мл) и специфичностью выявляющая ЛПС бактерий *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis* и не реагирующая с ЛПС *Yersinia enterocolitica* 0:3, *Y. enterocolitica* 0:9, *Salmonella typhimurium* и *F. tularensis* [28].

В Специализированной коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных РКЖ (СХЖ РАСХН) ВИЭВ при Государственном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» Россельхозакадемии (ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии) Москвы под № 90 в 2015 г. депонирован штамм F26 – продуцент МКА к олигопо-

лисахаридному антигену *B. abortus*, который можно использовать при изготовлении иммуноферментной тест-системы для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота [25]. Как отмечают разработчики, сотрудники ООО «Научно-производственная фирма ИММУНОБИОТЕХ», использование такой тест-системы позволяет не только выявлять специфические антитела у животных, инфицированных как *B. abortus*, так и *B. melitensis*, но и повышает эффективность противоэпизоотических мероприятий, сокращает сроки оздоровления неблагополучных по бруцеллезу хозяйств.

В филиале ФГБУ 48 ЦНИИ МО РФ в 2017 г. получены и охарактеризованы гибридомы-продуценты МКА к специфическим антигенам возбудителя бруцеллеза (232B6H7, 232G12F7, 233B2C5), которые в сочетании с бруцеллезными кроличьими иммуноглобулинами позволяют выявлять микробные клетки типовых штаммов различных видов бруцелл в концентрации от $0,25 \cdot 10^6$ до $1,0 \cdot 10^6$ м.к./мл и не взаимодействуют с культурами гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ м.к./мл. Гибридомы-продуценты и препараты специфических бруцеллезных МКА могут быть использованы для разработки и производства иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем [29].

Все вышеизложенное свидетельствует об эффективности использования МКА в диагностике бруцеллеза, а также о необходимости проведения дальнейших разработок по созданию и внедрению в практическое здравоохранение новых препаратов для борьбы с этим особо опасным заболеванием. Быстрые и чувствительные тесты с возможностью детекции возбудителя у животных и в продуктах животноводства (молоко, молочные продукты, мясо, мясные продукты) помогут предотвратить распространение бруцеллеза среди людей, исключив контактный и алиментарный пути передачи инфекции [30].

МКА в диагностике чумы. Чума до настоящего времени остается серьезной проблемой для эндемичных районов и для мирового здравоохранения в целом, что диктует актуальность проведения научных исследований по совершенствованию диагностических препаратов, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию этой инфекции. МКА в силу своей высокой специфичности, стандартности и технологичности оказались исключительно удобным и широко применяемым диагностическим средством. Реагенты, приготовленные на их основе, обладают большим преимуществом. Так, в ФБУН ГНЦ ПМБ получены и депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» под номерами H19, H13 и H18 штаммы гибридных клеток *Mus musculus* 5G6 (МКА к V антигену *Yersinia pestis*), гибридных клеток *Mus musculus* 10G4 и 13P8 (МКА к капсульному F1 антигену *Y. pestis*) [31–33]. Синтезированные МКА оказались пригодными для

разработки диагностических реагентов. Так, гибридому 10G4 использовали для конструирования латексной тест-системы в качестве источника МКА (IgG), которые специфически взаимодействовали с F1-антигеном чумного микроба и не давали перекрестных реакций с антигенами других микроорганизмов. На основании выполненной работы разработан и утвержден комплект нормативной документации, включающий инструкцию по применению и ТУ 9388-136-78095326-2011 на диагностикум «Набор реагентов для определения капсульного F1-антигена *Yersinia pestis* в реакции латекс-агглютинации», который успешно прошел комиссионные испытания на базе Иркутского противочумного института. Показано, что иммуноанализ на основе цветных латексов позволяет существенно сократить и упростить процедуру тестирования, не требуя сложного лабораторного оборудования и специально обученного персонала. В целом полученные характеристики и результаты апробации свидетельствуют о высокой чувствительности и специфичности высушенной латексной суспензии, которая выявляет штаммы возбудителя чумы в концентрации 10^5 – $2,0 \cdot 10^6$ м.к./мл и выше и не имеет перекрестной активности в отношении гетерологичных микроорганизмов. Предел обнаружения капсульного F1-антигена составил 4 нг/мл [34]. При разработке описанного набора использовались стандартные иммунологические подходы, основывающиеся на выявлении F1-антигена или антител к нему. Вместе с тем некоторые штаммы *Y. pestis* не продуцируют F1-антиген, сохраняя при этом вирулентность, что свидетельствует о несовершенстве использования этого антигена в качестве мишени для определения возбудителя. В связи с этим Т.А. Иващенко с соавт. [35] на основе пары МКА 5G6 и 2B8 сконструирована иммуноферментная моноклональная тест-система для выявления V-антигена (предел обнаружения – 2 нг/мл), которая также успешно прошла межлабораторные медицинские испытания на базе Иркутского противочумного института, что позволило рекомендовать ее в качестве альтернативы или в дополнение к другим диагностическим методам. Кроме экспериментальных препаратов на основе МКА, в ФБУН ГНЦ ПМБ есть и зарегистрированные – иммунохроматографические тест-системы, предназначенные для экспресс-выявления и идентификации возбудителя чумы. Одна из них обеспечивает специфическое обнаружение *Y. pestis* в концентрации 10^7 м.к./мл и капсульного антигена F1 в концентрации 0,01 мг/мл.

В РосНИПЧИ «Микроб» разработана и зарегистрирована диагностическая иммуноферментная тест-система (РЗН 2013/711), основу которой составили МКА к капсульному антигену *Y. pestis*. Набор «Тест-система иммуноферментная для детекции чумного микроба моноклональная (ИФАПестФ1-М)» характеризуется высокой специфичностью и позволяет выявлять капсулосодержащие штаммы возбудителя чумы в образцах биологического мате-

риала и проводить идентификацию чистых культур с чувствительностью $5 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ м.к./мл. Важным преимуществом тест-системы ИФА является объективный учет результатов анализа и возможность их документирования [36].

В Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте еще в 1990-е гг. проводились исследования по разработке экспериментальных препаратов для диагностики типичных и атипичных штаммов *Y. pestis* на основе МКА, специфичных к капсульному антигену F1 возбудителя чумы (гибрида Г4-В8/Е5) и к поверхностному белку чумного микроба FV (гибрида Г4-Е6/Н8). Позже эти МКА А.Л. Трухачев с соавт. [37] предложили использовать для идентификации видов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* путем определения продукции видоспецифических антигенов F1 и FV чумного микроба в реакции непрямой иммунофлуоресценции. В настоящее время отсутствуют диагностические тест-системы на основе МКА, имеющие высокую степень достоверности, для проведения идентификации штаммов возбудителей чумы и псевдотуберкулеза, в том числе и антигенизмененных штаммов, выделенных от больных людей, животных и из объектов окружающей среды. Это дает основания совершенствовать данное направление с использованием МКА и расширять спектр зарегистрированных препаратов для выявления *Y. pestis*.

МКА в диагностике холеры. Одной из актуальных опасных инфекционных болезней является холера, прогноз по которой в мире и для России остается неблагоприятным. Эффективность исследований на выявление возбудителя зависит от наличия высокочувствительных и специфичных реагентов для лабораторной диагностики холеры. Создание таких наборов возможно с использованием МКА. Сведения о холерных моноклональных препаратах, имеющих диагностическую значимость, появились в 1990-е гг. в публикациях сотрудников Ростовского-на-Дону противочумного института. В диссертационных работах О.С. Бурлаковой (1992 г.) и Л.П. Алексеевой (1993 г.) подробно описаны гибридомы-продуценты МКА к О-антигену ЛПС и их использование в качестве диагностических реагентов при проведении тонкого эпитопного анализа липополисахарида, а также при выяснении функциональной роли отдельных О-антигенных детерминант ЛПС и комплементарных им иммуноглобулинов в иммуногенезе инфекции. К 2000 г. получен набор гибридом, продуцирующих МКА к R-формам холерных вибрионов, которые в слайд-агглютинации взаимодействовали с атипичными штаммами *Vibrio cholerae* O1. Для расширения спектра выявляемых детерминант применяли смеси моноклональных иммуноглобулинов. С момента появления в 1992 г. нового возбудителя холеры актуальными стали исследования по получению гибридом-продуцентов МКА, направленных к антигенным детерминантам *V. cholerae* O139. Так, Л.П. Алексеевой с соавт. [38] удалось вывести стабильные гибридо-

мы, синтезирующие МКА O139, на основе которых разработали экспериментальные серии люминесцирующих препаратов. Созданная в институте к 2012 г. коллекция гибридом-продуцентов МКА явилась отправной точкой для регистрации в Росздравнадзоре наборов реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом РА «ИГ-*V. cholerae* O1/O139-РА» (РЗН 2015/2336) и «Иммуноглобулины моноклональные диагностические флуоресцирующие сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом РИФ «ИГ-*V. cholerae* O1/O139-РИФ» (РЗН 2014/2142). Применение наборов для реакции слайд-агглютинации и иммунофлуоресценции перспективно как в стационарных, так и мобильных лабораториях, в том числе и при проведении мониторинга объектов окружающей среды в случае постановки реакции с набором «ИГ-*V. cholerae* O1/O139-РИФ» (РЗН 2014/2142), который можно использовать для выявления возбудителя холеры не только после выделения чистой культуры, но и в нативном материале различного происхождения.

Для планирования рационального объема противохолерных мероприятий большое значение имеет своевременное определение токсигенности холерных вибрионов. Так, в Ростовском-на-Дону противочумном институте получены гибридомы-продуценты МКА, направленных к расположенным вблизи ганглиозид-связывающего участка эпитопам В-субъединицы холерного токсина и блокирующих связывание токсина с рецепторами GM1. В результате проведенных исследований О.В. Маркина с соавт. [39] оптимизировали ИФА двойных антител, который позволил оценить токсинопродукцию штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп с чувствительностью метода 50 нг/мл, а также рекомендовали использовать нитроцеллюлозную мембрану для постановки GM1-дот-ИФА, что повышало чувствительность метода до 10 нг/мл. Позже были получены моноклональные пероксидазные конъюгаты для выявления *V. cholerae* O1, O139 [40] и *tcr+* штаммов в прямом варианте твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) и в дот-варианте (ДИА) [41].

Работы по совершенствованию ИФА с использованием МКА проводились и в РосНИПЧИ «Микроб». Сконструированы экспериментальные иммуноферментные тест-системы, предназначенные для детекции *V. cholerae* O139 в концентрации от $7,5 \cdot 10^4$ до $2,3 \cdot 10^6$ м.к./мл в зависимости от штамма, для контроля биосинтеза типоспецифического О-антигена при производстве бивалентной химической вакцины, для обнаружения холерного токсина в ИФА и ДИА [42, 43]. А в 2016 г. предложены способ и набор для определения продукции холерного токсина и дифференциации эпидемически значимых штаммов холерных вибрионов классического и Эль Тор биоваров с использованием МКА, специ-

фичных к В-субъединице холерного токсина [44]. Тест-система для определения продукции холерного токсина штаммами *V. cholerae* (ИФАХолХТ-М) зарегистрирована в качестве изделия медицинского назначения (РЗН 2016/5013).

Специалисты ФБУН ГНЦ ПМБ, владеющие технологией и большим опытом в разработке иммунохроматографических тестов, сконструировали и зарегистрировали в качестве медицинских изделий ИХ-полоски для быстрой идентификации возбудителя холеры О1 группы «Тест-полоска *V. cholerae* О1» (РЗН 2013/270) и для быстрой идентификации токсигенных штаммов возбудителя холеры «Тест-полоска *V. cholerae* tox+» (РЗН 2015/2650) [45]. Чувствительность ИХ-тест-полосок – 10^8 – 10^9 м.к./мл.

Несмотря на уже достигнутые успехи в получении холерных моноклональных диагностикумов, работа должна продолжаться не только по пути расширения спектра наборов реагентов, но и с привлечением современных технологий. В последнее десятилетие существенное развитие получила технология анализа сложных биологических систем с помощью биологических микрочипов (биочипов), при создании которых сочетаются принцип миниатюризации и многофакторного анализа, что приводит к повышению производительности исследований и снижению себестоимости анализа [46]. Перспективным является и создание комплексных тест-систем для одновременного выявления двух и более возбудителей ООИ [23]. Специалисты ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения» разработали иммунохроматографическое устройство для индикации пяти видов токсинов (ботулинические токсины типов А и В в концентрации 5 и 10 нг/мл соответственно, стафилококковый энтеротоксин типа В – 40 нг/мл, холерный экзотоксин – 500 нг/мл, рицин – 80 нг/мл) в едином цикле анализа, что увеличивает производительность за счет уменьшения промежуточных манипуляций и уменьшает количество расходных материалов. Вышесказанное позволяет рассматривать мультианалитный анализ как эффективный и удобный инструмент экспресс-индикации [47]. Однако подобные наборы пока не внедрены в лабораторную практику.

МКА в диагностике сапа и мелиоидоза. Сап и мелиоидоз – особо опасные инфекционные болезни, вызываемые патогенными *Burkholderia mallei* и *B. pseudomallei*. На сегодняшний день в нашей стране не зарегистрировано ни одного достоверного случая заболеваний, вызванных этими возбудителями. Но сведения о возможном их распространении за пределы эндемичных регионов и вероятность заноса инфекции привели к росту исследований в области диагностики сапа и мелиоидоза [48, 49]. В Волгоградском научно-исследовательском противочумном институте создана коллекция гибридом-продуцентов к антигенным детерминантам *B. mallei* и *B. pseudomallei*, которая использовалась для создания иммунодиагностических препаратов. В разные годы получены

экспериментальные реагенты для реакции агглютинации, иммунодиффузии, ТИФА, метода флуоресцирующих антител (МФА) [50]. Важным результатом проведенных исследований является регистрация двух наборов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие мелиоидозные моноклональные сухие» (ФСР 2011/11615) и «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сапные моноклональные сухие» (ФСР 2011/11614), которые используются в лабораторной диагностике.

В ФБУН ГНЦ ПМБ получены гибридомы (3D3, 2D11), продуцирующие МКА к ЛПС *B. mallei* и *B. pseudomallei*. На их основе сконструированы экспериментальные ИХ-тесты, которые можно использовать в качестве одного из инструментов детекции возбудителей сапа и мелиоидоза, причем результат будет известен через 10 мин [51]. Также С.С. Ветчинин с соавт. [52] успешно применили МКА 3D3 и 2D11 для выявления и внутривидовой дифференциации штаммов патогенных буркхолдерий в дот-блот анализе при совместном использовании ПЦР-РВ. При этом МКА 3D3, связываясь с клетками штаммов обоих возбудителей, демонстрируют родоспецифичность, а МКА 2D11 – штаммоспецифичность, избирательно не взаимодействуя с клетками штаммов Р1 *B. mallei* и 100 *B. pseudomallei*. Сделан вывод о том, что сочетание видоспецифичной амплификации ДНК (ПЦР-РВ) и иммунного анализа (дот-блот) с использованием набора МКА различного профиля взаимодействия со штаммами перспективно для внутривидовой дифференциации патогенных буркхолдерий.

В 48 ЦНИИ МО РФ (г. Киров) были получены препараты МКА, выделенные и очищенные из асцитных жидкостей, на основе которых изготовлены специфические компоненты для иммуоферментных моноклональных тест-систем ($0,5 \cdot 10^6$ м.к./мл). Показана принципиальная возможность проведения дифференциации *B. mallei* и *B. pseudomallei* методом ИФА при отсутствии перекрестных реакций с близкородственными сапрофитами и гетерологичными микроорганизмами в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ м.к./мл. Тест-системы перспективны для последующей регистрации в качестве медицинских изделий для диагностики *in vitro* [53, 54].

Осуществление мониторинга заболеваний мелиоидозом и сапом на территории РФ требует не только эффективного взаимодействия между медицинскими учреждениями и организациями, но и обеспечения эффективными средствами диагностики.

Таким образом, МКА в силу своей высокой специфичности, стандартности и технологичности оказались исключительно удобным и широко применяемым в настоящее время диагностическим средством, в том числе и для выявления возбудителей ООИ. В связи с этим исследования, направленные на разработку и регистрацию новых наборов моноклональных реагентов в качестве медицинских изделий, не утратили своей актуальности и прак-

тической значимости. Привлечение в диагностику ООИ современных более эффективных препаратов на основе МКА позволит повысить качество и достоверность лабораторного анализа, при этом обязательным условием является их внедрение в практическое здравоохранение. Наиболее перспективными представляются дот-иммуноанализ, изготовление иммунохроматографических тестов и создание иммуночипов. Усилия разработчиков должны быть направлены на повышение порога чувствительности тест-систем, полное исключение неспецифических реакций, упрощение процедуры постановки и учета реакции и доведение экспериментальных разработок до выпуска сертифицированного препарата.

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

Список литературы

- Альшулер Е.П., Серебряная Д.В., Катруха А.Г. Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности. *Успехи биологической химии*. 2010; 50:203–58.
- Самарцева Т.Г., Оксанич А.С., Гаврилова Н.Ф., Яковлева И.В., Свиридов В.В., Зверев В.В. Применение универсальных плазмидных конструкций для получения полноразмерных рекомбинантных антител заданной специфичности в эукариотических клетках. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2018; 3:32–9. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-3-32-39.
- Луговской А.А. Инженерия терапевтических антител: теория и практика. *Молекулярная биология*. 2017; 51(6):886–98. DOI: 10.7868/S0026898417060027.
- Карабельский А.В., Неманкин Т.А., Улитин А.Б., Ваганов А.С., Мосина Е.А., Иванов Р.А. Разработка инновационных препаратов моноклональных антител. *Биотехнология*. 2017; 33(1):10–29. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-1-10-29.
- Белова Е.В., Хлынцева А.Е., Дятлов И.А., Шемякин И.Г. Штамм гибридных культивируемых клеток животных *Mus musculus* 1E6 – продуцент моноклональных антител, специфичных к спорам *Bacillus anthracis*. Патент РФ № 2439148, опублик. 10.01.2012. Бюл. № 1.
- Кравец Е.В., Дугаржапова З.Ф., Родзиковский А.В., Хлынцева А.Е., Лунева Н.М., Белова Е.В., Колосова Н.В., Рудницкий С.Ю., Соловьев П.В., Баранова Е.В., Бикетов С.Ф. Применение методов латекс-агглютинации и иммунохроматографии для ускоренной идентификации культур *Bacillus anthracis* при эпидемиологических расследованиях вспышек. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011; 1(107):81–2. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-81-82.
- Хлынцева А.Е., Лунева Н.М., Белова Е.В., Дятлов И.А., Шемякин И.Г. Разработка и испытания диагностикума на основе моноклональных антител для определения спор возбудителя сибирской язвы в реакции латекс-агглютинации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011; 4(110):71–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-71-75.
- Хлынцева А.Е., Белова Е.В., Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Куличенко А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г. Конструирование тест-системы для селективного концентрирования спор *Bacillus anthracis* на основе магнитных частиц с иммобилизованными моноклональными антителами. *Биотехнология*. 2010; 4:81–8.
- Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Еремкин А.В., Елагин Г.Д., Кукулина Г.В., Барамзина Г.В., Ипатов С.С. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления *Bacillus anthracis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 3:78–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-78-82.
- Романов М.Г., Кириллов Л.В., Яковлева И.В., Свиридов В.В. ИФА для определения протективного антигена *Bacillus anthracis*. *Ветеринария*. 2005; 5:27–9.
- Руденко Н.В., Аббасова С.Г., Гришин Е.В. Получение и характеристика моноклональных антител к протективному антигену *Bacillus anthracis*. *Биоорганическая химия*. 2011; 37(3):316–21.
- Белова Е.В., Лунева Н.М., Колесников А.В., Козырь А.В., Шемякин И.Г., Дятлов И.А. Способ иммунофлуоресцентного определения протективного антигена возбудителя сибирской язвы. Патент РФ № 2478970, опублик. 10.04.2013. Бюл. № 10.
- Козырь А.В., Колесников А.В., Хлынцева А.Е., Белова Е.В., Шемякин И.Г. Способ определения наличия протективного антигена сибирской язвы на основе иммунодетекции, сопряженной с полимеразной цепной реакцией. Патент РФ № 2470307, опублик. 20.12.2012. Бюл. № 35.
- Козырь А.В., Колесников А.В., Хлынцева А.Е., Белова Е.В., Шемякин И.Г. Способ определения летального фактора сибирской язвы на основе иммунодетекции, сопряженной с полимеразной цепной реакцией. Патент РФ № 2486524, опублик. 27.06.2013. Бюл. № 18.
- Рябко А.К., Марьин М.А., Карцева А.С., Зенинская Н.А., Силкина М.В., Мунтян Я.О., Фирстова В.В., Шемякин И.Г. Штамм гибридных культивируемых клеток *H. sapiens/Mus musculus* 8D4E9-BA-LF-продуцент человеческих моноклональных антител против летального фактора возбудителя сибирской язвы. Патент РФ № 2699193, опублик. 03.09.2019. Бюл. № 25.
- Сырова Н.А., Терешкина Н.Е., Девдариани З.Л. Современное состояние иммунодиагностики туляремии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008; 3(97):12–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-3(97)-12-15.
- Сырова Н.А., Терехова И.В., Терешкина Н.Е., Девдариани З.Л., Исляева М.Н., Голова А.Б., Гусева Н.П., Плотнокова Е.А., Волох О.А., Ермаков Н.М., Киреев М.Н. Культивирование гибридом – продуцентов диагностически значимых моноклональных антител к *Francisella tularensis*. *Биотехнология*. 2012; 2:66–72.
- Терешкина Н.Е., Терехова И.В., Сырова Н.А., Девдариани З.Л., Ляшова О.Ю., Григорьева Г.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Иваненко И.Л., Захарова Н.Б., Безрукова Г.А., Спирин В.Ф. Конструирование и медицинские испытания моноклональной дот-иммуноферментной тест-системы для детекции туляремии микроба «ДИАТул-М». *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 2:42–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-42-45.
- Белова Е.В., Хлынцева А.Е., Благодатских С.А., Шемякин И.Г. Штамм гибридных культивируемых клеток животных *Mus musculus* 11D6-продуцент моноклональных антител, специфичных к липополисахаридам *Francisella tularensis*. Патент РФ № 2451078, опублик. 20.05.2012. Бюл. № 14.
- Терехова И.В., Сырова Н.А., Терешкина Н.Е., Михеева Е.А., Девдариани З.Л. Штамм гибридных культивируемых клеток животных *Mus musculus Francisella tularensis* 1D6 – продуцент моноклональных антител к липополисахариду туляремии микроба. Патент РФ № 2621379, опублик. 05.06.2017. Бюл. № 16.
- Зайцев А.А., Гнусарева О.А., Царева Н.С., Остапович В.В., Борздова И.Ю., Куличенко А.Н. Применение иммунохроматографических тест-систем для экспресс-выявления липополисахарида *Francisella tularensis* при мониторинге природных очагов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 1:78–80. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-78-80.
- Еремкин А.В., Елагин Г.Д., Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Богачева Н.В., Кытманов А.А., Кукулина Г.В., Тихвинская О.В. Разработка иммуноферментной и иммунохроматографической моноклональных тест-систем для выявления возбудителя туляремии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(3):184–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-3-184-187.
- Туманов А.С., Воробьев К.А., Печенкин Д.В., Елагин Г.Д., Кукулина Г.В., Еремкин А.В., Кытманов А.А., Богачева Н.В., Шурупов С.А., Ипатов С.С. Разработка иммуноферментных моноклональных тест-систем, предназначенных для выявления возбудителей туляремии, сапа, мелиоидоза и сибирской язвы. *Вестник войск РХБ защиты*. 2017; 1(2):21–7.
- Жарникова И.В., Ефременко В.И., Жарникова Т.В., Курчева С.А., Кальной С.М., Ефременко Д.В., Исакова А.А., Инденбом А.В. Серологические методы выявления возбудителя туляремии и их оценка. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2019; 4:32–8. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-4-32-38.
- Юдин В.И., Быкова Н.Н., Косарева Т.В., Ванин С.В., Гулюкин М.И., Скляр О.Д., Коромылова И.А. Штамм F26 постоянной гибридной линии клеток мыши *Mus musculus* – продуцент моноклональных антител к олигополисахаридному (ОПС) антигену *B. abortus*. Патент РФ № 2560260, опублик. 20.08.2015. Бюл. № 23.
- Ескендинова С.З., Булашев А.К., Боровиков С.Н., Барамова М.А. Получение моноклональных антител к бактериям рода *Brucella*. *Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана*. 1990; 10:68–71.
- Михайлов Л.М., Титенко А.М., Захлебная О.Д., Лаукнер И.В. Штамм гибридных культивируемых клеток животных *Mus musculus* L. – продуцент моноклональных антител, специфичных к препарату белков бруцелл с молекулярным весом 18 и 38 кД. Патент РФ № 2113475. Опублик. 20.06.1998.
- Фельдшерова А.А., Эльгорт Д.А., Коноплева М.В., Хац Ю.С., Третьяков О.Ю., Кулаков Ю.К., Толмачева Т.А., Желудков М.М., Суслов А.П. Высокоэффективная иммуноферментная тест-система на основе моноклональных антител для выявления антигенов бруцелл. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2007; 1:52–6.

29. Кукулина Г.В., Елагин Г.Д., Фоменков О.О., Печенкин Д.В., Еремкин А.В., Кытманов А.А. Получение гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам возбудителя бруцеллеза. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 2:67–71. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-67-71.
30. Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Хачатурова А.А., Бердникова Т.В., Манин Е.А., Семенов О.В., Малеева О.В., Куличенко А.Н. Бруцеллез в Российской Федерации в 2018 году. Информационный бюллетень. Ставрополь; 2019. 38 с.
31. Белова Е.В., Иващенко Т.А., Игнашина Е.Н., Шемякин И.Г. Штамм гибридных культивируемых клеток животных *Mus musculus* 3F8 – продуцент моноклональных антител, специфичных к капсульному F1 антигену *Yersinia pestis*. Патент РФ № 2460788, опубл. 10.09.2012. Бюл. № 25.
32. Белова Е.В., Иващенко Т.А., Куценко А.К., Дятлов И.А., Шемякин И.Г. Штамм гибридных клеток животных *Mus musculus* 5G6 – продуцент моноклональных антител, специфичных к V антигену *Yersinia pestis*. Патент РФ № 2478703, опубл. 10.04.2013. Бюл. № 10.
33. Белова Е.В., Иващенко Т.А., Игнашина Е.Н., Шемякин И.Г. Штамм гибридных клеток животных *Mus musculus* 10G4 – продуцент моноклональных антител, специфичных к капсульному FL антигену *Yersinia pestis*. Патент РФ № 2460787, опубл. 10.09.2012. Бюл. № 25.
34. Иващенко Т.А., Белова Е.В., Дентовская С.В., Белькова С.А., Балахонов С.В., Шемякин И.Г. Разработка латекс-агглютинационной тест-системы для выявления капсульного антигена F1 *Yersinia pestis*. *Биотехнология*. 2012; 6:76–85.
35. Иващенко Т.А., Белова Е.В., Дентовская С.В., Белькова С.А., Балахонов С.В., Игнатова С.Г., Шемякин И.Г. Разработка и испытание иммуноферментной моноклональной тест-системы для выявления V антигена *Yersinia pestis*. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2014; 50(2):211–8.
36. Девдариани З.Л., Сырова Н.А., Михеева Е.А., Терехова И.В., Ермаков Н.М., Григорьева Г.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В. Конструирование и медицинские испытания моноклональной иммуноферментной тест-системы для выявления капсулосодержащих штаммов чумного микроба «ИФА ПестФ1-М». *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 3:85–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-85-89.
37. Трухачев А.Л., Арсеньева Т.Е., Лебедева С.А., Алексеева Л.П., Васильева Е.А. Способ идентификации штаммов вида *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*. Патент РФ № 2422535, опубл. 27.06.2011. Бюл. № 18.
38. Алексеева Л.П., Мазрухо Б.Л., Чемисова О.С., Сальникова О.И., Маркина О.В., Лобанов В.В. Изучение с помощью моноклональных антител полисахаридных антигенов *Vibrio cholerae* O139 различного происхождения. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2002; 4:25–9.
39. Маркина О.В., Алексеева Л.П., Телесманич Н.Р., Чемисова О.С., Акулова М.В., Маркин Н.В. GM1-ДОТ-ИФА для выявления токсинпродуцирующих штаммов *Vibrio cholerae*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 5:49–52.
40. Алексеева Л.П., Козлова Г.А., Маркина О.В., Кретенчук О.Ф., Яговкин М.Э., Бурша О.С. Использование моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации холерных вибрионов O1, O139 в реакции дот-иммуноанализа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 3:26–9.
41. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Зюзина В.П., Кретенчук О.Ф., Яговкин М.Э. Изучение диагностических возможностей моноклональных антител, специфичных к мембранному белку возбудителя холеры, в иммуноферментном анализе. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 3:45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-45-48.
42. Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Осина Н.А., Захарова Т.Л. Получение и характеристика антителопродуцирующих гибридом и моноклональных иммуноглобулинов к энтеротоксину *Vibrio cholerae*. *Биотехнология*. 2014; 30(3):49–54.
43. Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Осина Н.А., Щербакова С.А. Определение холерного токсина у штаммов *V. cholerae* в иммуноферментном анализе с использованием моноклональных антител. *Биозащита и биобезопасность*. 2014; 6(4):38–42.
44. Михеева Е.А., Осина Н.А., Девдариани З.Л., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Способ и набор для определения продукции холерного токсина и дифференциации эпидемически значимых штаммов холерных вибрионов классического и элзтор биоваров. Патент РФ № 2611359, опубл. 21.02.2017. Бюл. № 6.
45. Дятлов И.А. Роль Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии в решении современных проблем медицинской микробиологии. *Бактериология*. 2016; 1(1):7–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-7-15.
46. Уткин Д.В., Осина Н.А., Спицын А.Н., Киреев В.Н., Громова О.В., Захарова Т.Л., Найденова Е.В., Куклев В.Е. Разработка биочипа для выявления противохолерных антител в сыворотке крови человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 2:50–3.
47. Шиленко И.В., Ярков С.П., Шаулина Е.К., Титов А.А., Бровкина А.Н., Храмов Е.Н. Разработка мультианалитного иммунохроматографического устройства для индикации токсинов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4:103–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-103-106.
48. Антонов В.А., Илюхин В.И., Храпова Н.П., Прохвятилова Е.В., Викторов Д.В., Сенина Т.В., Будченко А.А., Ткаченко Г.А., Алексеева В.В., Захарова И.Б., Савченко С.С., Зинченко О.В., Сорокина Ю.И., Алексеев В.В. Современные подходы к диагностике сапа и мелиоидоза. Идентификация и типирование *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; 2(112):46–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-2(112)-46-50.
49. Захарова И.Б., Топорков А.В., Викторов Д.В. Мелиоидоз и сап: современное состояние проблемы и актуальные вопросы эпидемиологического надзора. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2018; 6:103–9. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-6-103-109.
50. Корсакова И.И., Антонов В.А., Храпова Н.П., Захарова Т.В., Пименова Е.В., Ким Е.Э., Меринова Л.К., Сенина Т.В., Ткаченко Г.А., Савченко С.С., Агеева Н.П., Молчанова Е.В., Лопастейская Я.А., Прохвятилова Е.В. Идентификация возбудителей сапа и мелиоидоза на основе принципов полифазного таксономического подхода. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2016; 6: 25–34.
51. Федюкина Г.Н., Ветчинин С.С., Баранова Е.В., Руднички С.Ю., Соловьев П.В., Колосова Н.В., Бикетов С.Ф. Получение компонентов иммунохроматографического теста для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза. *Биотехнология*. 2015; 1:85–92.
52. Ветчинин С.С., Щит И.Ю., Шевяков А.Г., Бикетов С.Ф. Возможность выявления штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза при сочетании методов иммуноблоттинга и амплификации ДНК. *Инфекция и иммунитет*. 2019; 9(2):404–8. DOI: 10.15789/2220-7619-2019-2-404-408.
53. Кытманов А.А., Елагин Г.Д., Кукулина Г.В., Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Еремкин А.В., Ипатов С.С., Зиганшин Э.Р. Разработка иммуноферментных моноклональных тест-систем для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 3:60–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-60-65.
54. Кукулина Г.В., Елагин Г.Д., Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Еремкин А.В., Кытманов А.А., Шурупов С.А., Ипатов С.С. Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к антигенам *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2019; 4:78–82. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-4-78-82.

References

1. Al'tshuler E.P., Serebryanaya D.V., Katrukha A.G. [Production of recombinant antibodies and methods for increasing their affinity]. *Uspekhi Biologicheskoy Khimii [Advances in Biological Chemistry]*. 2010; 50:203–58.
2. Samartseva T.G., Oksanich A.S., Gavrilova N.F., Yakovleva I.V., Sviridov V.V., Zverev V.V. [The use of universal plasmid constructs for the production of full-length recombinant antibodies with a set specificity in eukaryotic cells]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2018; 3:32–9. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-3-32-39.
3. Lugovskoy A.A. [Therapeutic antibody engineering: theory and practice]. *Molekulyarnaya Biologiya [Molecular Biology]*. 2017; 51(6):886–98. DOI: 10.7868/S0026898417060027.
4. Karabel'sky A.V., Nemankin T.A., Ulitin A.B., Vaganov A.S., Mošina E.A., Ivanov R.A. [Development of innovative preparations of monoclonal antibodies]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2017; 33(1):10–29. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-7-33-1-10-29.
5. Belova E.V., Khlyntseva A.E., Dyatlov I.A., Shemyakin I.G. [The strain of hybrid cultured animal cells *Mus musculus* 1E6 – producer of monoclonal antibodies specific to *Bacillus anthracis* spores]. RF patent No. 2439148, publ. 10.01.2012. Bul. No. 1.
6. Kravets E.V., Dugazhapova Z.F., Rodzikovsky A.V., Khlyntseva A.E., Luneva N.M., Belova E.V., Kolosova N.V., Rudnitsky S.Yu., Solov'ev P.V., Baranova E.V., Bicketov S.F. [Application of latex agglutination and immune chromatography methods for rapid identification of *Bacillus anthracis* cultures in the epidemiological investigation of outbreaks]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2011; (1(107)):81–2. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-81-82.
7. Khlyntseva A.E., Luneva N.M., Belova E.V., Dyatlov I.A., Shemyakin I.G. [Development and testing of monoclonal antibodies-based diagnostic preparation for *Bacillus anthracis* spores detection using latex agglutination method]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2011; (4(110)):71–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-71-75.
8. Khlyntseva A.E., Belova E.V., Zharnikova I.V., Tyumentseva I.S., Kulichenko A.N., Dyatlov I.A., Shemyakin I.G. [Construction of a test system for selective concentration of *Bacillus anthracis* spores

based on magnetic particles with immobilized monoclonal antibodies]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2010; 4:81–8.

9. Pechenkin D.V., Fomenkov O.O., Eremkin A.V., Elagin G.D., Kuklina G.V., Baramzina G.V., Ipatov S.S. [Development of enzyme-immunoassay for *Bacillus anthracis* detection]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (3):78–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-78-82.

10. Romanov M.G., Kirillov L.V., Yakovleva I.V., Sviridov V.V. [ELISA for the detection of protective antigen of *Bacillus anthracis*]. *Veterinariya [Veterinary Medicine]*. 2005; 5:27–9.

11. Rudenko N.V., Abbasova S.G., Grishin E.V. [Obtaining and characterization of monoclonal antibodies to the protective antigen of *Bacillus anthracis*]. *Bioorganicheskaya Khimiya [Bioorganic Chemistry]*. 2011; 37(3):316–21.

12. Belova E.V., Luneva N.M., Kolesnikov A.V., Kozyr' A.V., Shemyakin I.G., Dyatlov I.A. [Method for immunofluorescent detection of protective antigen of anthrax agent]. RF patent No. 2478970, publ. 10.04.2013. Bul. No. 10.

13. Kozyr' A.V., Kolesnikov A.V., Khlyntseva A.E., Belova E.V., Shemyakin I.G. Method for determining the presence of protective anthrax antigen based on immunodetection coupled with polymerase chain reaction. RF patent No. 2470307, publ. 20.12.2012. Bul. No. 35.

14. Kozyr' A.V., Kolesnikov A.V., Khlyntseva A.E., Belova E.V., Shemyakin I.G. [Method for detecting the lethal factor of anthrax based on immunodetection coupled with polymerase chain reaction]. RF patent No. 2486524, publ. 27.06.2013. Bul. No. 18.

15. Ryabko A.K., Mar'in M.A., Kartseva A.S., Zeninskaya N.A., Silkina M.V., Muntyan Ya.O., Firstova V.V., Shemyakin I.G. [The strain of hybrid cultured cells *H. sapiens* / *Mus musculus* 8D4E9-BA-LF – producer of human monoclonal antibodies against the lethal factor of anthrax agent]. RF patent No. 2699193, publ. 03.09.2019. Bul. No. 25.

16. Syrova N.A., Tereshkina N.E., Devdariani Z.L. [Current state of tularemia immunodiagnostics]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2008; (3(97)):12–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-3(97)-12-15.

17. Syrova N.A., Terekhova I.V., Tereshkina N.E., Devdariani Z.L., Islyayeva M.N., Golova A.B., Guseva N.P., Plotnikova E.A., Volokh O.A., Ermakov N.M., Kireev M.N. [Cultivation of hybridomas – producers of diagnostically significant monoclonal antibodies to *Francisella tularensis*]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2012; 2:66–72.

18. Tereshkina N.E., Terekhova I.V., Syrova N.A., Devdariani Z.L., Lyashova O.Yu., Grigor'eva G.V., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V., Ivanenko I.L., Zakharova N.B., Bezrukova G.A., Spirin V.F. [Constructing and medical trials of a monoclonal dot-immuno-enzyme test-system “DIA-Tul-M” for tularemia microbe detection]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (2):42–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-42-45.

19. Belova E.V., Khlyntseva A.E., Blagodatskikh S.A., Shemyakin I.G. [The strain of hybrid cultured animal cells *Mus musculus* 11D6-producer of monoclonal antibodies specific to *Francisella tularensis* lipopolysaccharides]. RF patent No. 2451078, publ. 20.05.2012. Bul. No. 14.

20. Terekhova I.V., Syrova N.A., Tereshkina N.E., Mikheeva E.A., Devdariani Z.L. [The strain of hybrid cultured animal cells *Mus musculus* *Francisella tularensis* 1D6 – producer of monoclonal antibodies to lipopolysaccharide of tularemia microbe]. RF patent No. 2621379, publ. 05.06.2017. Bul. No. 16.

21. Zaitsev A.A., Gnusareva O.A., Tsareva N.S., Ostapovich V.V., Borzdova I.Yu., Kulichenko A.N. [Immuno-chromatographic test system application for rapid detection of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide in monitoring of natural foci]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (1):78–80. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-78-80.

22. Eremkin A.V., Elagin G.D., Pechenkin D.V., Fomenkov O.O., Bogacheva N.V., Kytmanov A.A., Kuklina G.V., Tikhvinskaya O.V. [Development of enzyme immunoassay and immunochromatographic monoclonal test-systems to identify the causative agent of tularemia]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2016; 61(3):184–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-3-184-187.

23. Tumanov A.S., Vorob'ev K.A., Pechenkin D.V., Elagin G.D., Kuklina G.V., Eremkin A.V., Kytmanov A.A., Bogacheva N.V., Shurupov S.A., Ipatov S.S. [Development of monoclonal immuno-enzyme test-systems designed to detect the causative agents of tularemia, glanders, melioidosis, and anthrax]. *Vestnik Voisk RKhB Zashchity [Bulletin of the RCB Defense Troops]*. 2017; 1(2):21–7.

24. Zharnikova I.V., Efremenko V.I., Zharnikova T.V., Kurcheva S.A., Kal'noy S.M., Efremenko D.V., Isakova A.A., Indenbom A.V. [Serological methods for identifying the causative agent of tularemia and their assessment]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2019; 4:32–8. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-4-32-38.

25. Yudin V.I., Bykova N.N., Kosareva T.V., Vanin S.V., Gulyukin M.I., Sklyarov O.D., Koromyslova I.A. [Strain F26 of stable hybridoma cell line of the mouse *Mus musculus* – producer of monoclonal antibodies to oligopolysaccharide (OPS) antigen of *B. abortus*]. RF patent No. 2560260, publ. 20.08.2015. Bul. No. 23.

26. Eskendirova S.Z., Bulashev A.K., Borovikov S.N., Baramova M.A. [Obtaining monoclonal antibodies to bacteria of the genus *Brucella*]. *Vestnik Sel'skokhozyaystvennoy Nauki Kazakhstana [Bulletin of Agricultural Science of Kazakhstan]*. 1990; 10: 68–71.

27. Mikhailov L.M., Titenko A.M., Zakhlebnaya O.D., Laukner I.V. [The strain of hybrid cultured animal cells *Mus musculus* L. – producer of monoclonal antibodies specific to the preparation of *Brucella* proteins with molecular weight of 18 and 38 kDa]. RF patent No. 2113475. Publ. 20.06.1998.

28. Fel'dsherova A.A., El'gort D.A., Konopleva M.V., Hatz Yu.S., Tret'yakov O.Yu., Kulakov Yu.K., Tolmacheva T.A., Zheludkov M.M., Suslov A.P. [Highly efficient immuno-enzyme test-system based on monoclonal antibodies for the detection of *Brucella* antigens]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2007; 1:52–6.

29. Kuklina G.V., Elagin G.D., Fomenkov O.O., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kytmanov A.A. [Manufacturing of hybridomas-producers of monoclonal antibodies to brucellosis agent antigens]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (2):67–71. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-67-71.

30. Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Khachaturova A.A., Berdnikova T.V., Manin E.A., Semenko O.V., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. [Brucellosis in the Russian Federation in 2018]. [Newsletter]. Stavropol; 2019. 38 p.

31. Belova E.V., Ivashchenko T.A., Ignashina E.N., Shemyakin I.G. [The strain of hybrid cultured animal cells *Mus musculus* 3F8 – producer of monoclonal antibodies specific to the capsular F1 antigen of *Yersinia pestis*]. RF patent No. 2460788, publ. 10.09.2012. Bul. No. 25.

32. Belova E.V., Ivashchenko T.A., Kutsenko A.K., Dyatlov I.A., Shemyakin I.G. [The hybrid animal cell strain *Mus musculus* 5G6 – producer of monoclonal antibodies specific to the V antigen of *Yersinia pestis*]. RF patent No. 2478703, publ. 10.04.2013. Bul. No. 10.

33. Belova E.V., Ivashchenko T.A., Ignashina E.N., Shemyakin I.G. [The strain of hybrid animal cells *Mus musculus* 10G4 – producer of monoclonal antibodies specific to the capsular FL antigen of *Yersinia pestis*]. RF patent No. 2460787, publ. 10.09.2012. Bul. No. 25.

34. Ivashchenko T.A., Belova E.V., Dentovskaya S.V., Bel'kova S.A., Balakhonov S.V., Shemyakin I.G. [Development of a latex agglutination test-system for the detection of the capsular antigen F1 of *Yersinia pestis*]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2012; 6:76–85.

35. Ivashchenko T.A., Belova E.V., Dentovskaya S.V., Bel'kova S.A., Balakhonov S.V., Ignatov S.G., Shemyakin I.G. [Development and testing of an immuno-enzyme monoclonal test-system for the detection of V antigen of *Yersinia pestis*]. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya [Applied Biochemistry and Microbiology]*. 2014; 50(2):211–8.

36. Devdariani Z.L., Syrova N.A., Mikheeva E.A., Terekhova I.V., Ermakov N.M., Grigor'eva G.V., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V. [Construction and medical trials of monoclonal immuno-enzyme test-system for the detection of encapsulated plague agent strains, “EIAPESTF1-M”]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (3):85–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-85-89.

37. Trukhachev A.L., Arsen'eva T.E., Lebedeva S.A., Alekseeva L.P., Vasil'eva E.A. [Method for identification of strains of the species *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*]. RF patent No. 2422535, publ. 27.06.2011. Bul. No. 18.

38. Alekseeva L.P., Mazrukho B.L., Chemisova O.S., Sal'nikova O.I., Markina O.V., Lobanov V.V. [Study of polysaccharide antigens of *Vibrio cholerae* O139 of various origins using monoclonal antibodies]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2002; 4:25–9.

39. Markina O.V., Alekseeva L.P., Telesmanich N.R., Chemisova O.S., Akulova M.V., Markin N.V. [GM1-DOT-ELISA for the detection of toxin-producing strains of *Vibrio cholerae*]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2011; 5: 49–52.

40. Alekseeva L.P., Kozlova G.A., Markina O.V., Kretenchuk O.F., Yagovkin M.E., Bursha O.S. [The use of monoclonal peroxidase conjugates for the identification of *Vibrio cholerae* O1, O139 in the dot-immunoassay reaction]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2013; 3:26–9.

41. Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Zyuzina V.P., Kretenchuk O.F., Yagovkin M.E. [The study of diagnostic potential of monoclonal antibodies specific to the membrane protein of cholera agent in enzyme-linked immunoassay]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (3):45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-45-48.

42. Mikheeva E.A., Devdariani Z.L., Osina N.A., Zakharova T.L. [Obtaining and characterization of antibody-producing hybridomas and monoclonal immunoglobulins to *Vibrio cholerae* enterotoxin]. *Biotechnologiya* [Biotechnology]. 2014; 30(3):49–54.
43. Mikheeva E.A., Devdariani Z.L., Osina N.A., Shcherbakova S.A. [Detection of cholera toxin in *V. cholerae* strains in enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies]. *Biozashchita i Biobezopasnost'* [Biosecurity and Biosafety]. 2014; 6(4 (21)):38–42.
44. Mikheeva E.A., Osina N.A., Devdariani Z.L., Shcherbakova S.A., Kuttyrev V.V. [Method and kit for determination of cholera toxin production and differentiation of epidemically significant strains of classical and El Tor *Vibrio cholerae* biovars]. RF patent No. 2611359, publ. 21.02.2017. Bul. No. 6.
45. Dyatlov I.A. [The role of the State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology in solving current issues of medical microbiology]. *Bakteriologiya* [Bacteriology]. 2016; 1(1):7–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-7-15.
46. Utkin D.V., Osina N.A., Spitsyn A.N., Kireev M.N., Gromova O.V., Zakharova T.L., Naidenova E.V., Kuklev V.E. [Development of a biochip for detecting anti-cholera antibodies in human blood serum]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* [Clinical Laboratory Diagnostics]. 2015; 2:50–3.
47. Shilenko I.V., Yarkov S.P., Shaulina E.K., Titov A.A., Brovkina A.N., Khramov E.N. [Development of multi-analytical immune-chromatographic device for toxin indication]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2015; (4):103–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-103-106.
48. Antonov V.A., Ilyukhin V.I., Khrapova N.P., Prokhvatilova E.V., Viktorov D.V., Senina T.V., Budchenko A.A., Tkachenko G.A., Alekseeva V.V., Zakharova I.B., Savchenko S.S., Zinchenko O.V., Sorokina Yu.I., Alekseev V.V. [Modern approaches for detection of glanders and melioidosis. Identification and typing of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2012; (2(112)):46–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-2(112)-46-50.
49. Zakharova I.B., Toporkov A.V., Viktorov D.V. [Melioidosis and glanders: current state of the problem and topical issues of epidemiological surveillance]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2018; 6:103–9. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-6-103-109.
50. Korsakova I.I., Antonov V.A., Khrapova N.P., Zamarina T.V., Pimenova E.V., Kim E.E., Merinova L.K., Senina T.V., Tkachenko G.A., Savchenko S.S., Ageeva N.P., Molchanova E.V., Lopasteyskaya Ya.A., Prokhvatilova E.V. [Identification of glanders and melioidosis agents, based on the principles of the poly-phase taxonomic approach]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2016; 6:25–34.
51. Fedyukina G.N., Vetchinin S.S., Baranova E.V., Rudnitsky S.Yu., Solov'ev P.V., Kolosova N.V., Biketov S.F. [Obtaining the components of the immunochromatographic test to identify the causative agents of glanders and melioidosis]. *Biotechnologiya* [Biotechnology]. 2015; 1:85–92.
52. Vetchinin S.S., Shchit I.Yu., Shevyakov A.G., Biketov S.F. [Possibility of detecting the strains of glanders and melioidosis agents by combining methods of immunoblotting and DNA amplification]. *Infektsiya i Immunitet* [Infection and Immunity]. 2019; 9(2):404–8. DOI: 10.15789/2220-7619-2019-2-404-408.
53. Kytmanov A.A., Elagin G.D., Kuklina G.V., Pechenkin D.V., Fomenkov O.O., Eremkin A.V., Ipatov S.S., Ziganshin E.R. [Development of immuno-enzymatic monoclonal tests-systems for the detection of glanders and melioidosis agents]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2018; (3):60–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-60-65.
54. Kuklina G.V., Elagin G.D., Pechenkin D.V., Fomenkov O.O., Eremkin A.V., Kytmanov A.A., Shurupov S.A., Ipatov S.S. [Obtaining hybridomas producing monoclonal antibodies to *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* antigens]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2019; 4:78–82. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-4-78-82.

Author:

Kretenchuk O.F. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторе:

Кретенчук О.Ф. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-46-53

УДК 616.98:579.842.23

А.С. Вагайская, А.С. Трунякова, Т.И. Комбарова, С.В. Дентовская

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧУМЫ В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРИИ УРОВНЯ БИОБЕЗОПАСНОСТИ 2

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

Возбудитель чумы, *Yersinia pestis*, относится к I группе патогенности (опасности), что подразумевает работу с его штаммами «дикого типа» в УББ 3 (уровень биобезопасности) лаборатории. *Y. pestis* EV НИИЭГ является Δ pgm штаммом, что позволяет проводить эксперименты в УББ 2 лаборатории. Однако возникновение и развитие заболевания, вызванное этим штаммом, не может полностью повторять наблюдаемое при использовании вирулентных аналогов. Остаточную вирулентность штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для мышей можно повысить при введении препаратов железа *in vivo*. **Цель** исследования состояла в оптимизации методических приемов моделирования экспериментальной чумы у лабораторных животных после введения аттенуированных Δ pgm штаммов *Y. pestis* с использованием декстрана железа. **Материалы и методы.** Моделирование чумной инфекции у беспородных мышей проводили путем подкожного введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с добавлением декстрана железа. У животных ежедневно проводили оценку здоровья. В ходе эксперимента оценивали патологоанатомическую картину и обсемененность органов у мышей. **Результаты и обсуждение.** При подкожном введении штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в присутствии декстрана железа у мышей наблюдали бубонную форму чумы, приводящую к летальному исходу с патологическими изменениями внутренних органов, характерными для чумной инфекции. При ежедневном введении железа LD₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для мышей достоверно превышала таковую при однократном введении препарата. Различия в выживаемости животных в группах с однократным и многократным введением железа по сравнению с контрольными группами были достоверны. Таким образом, аттенуированные Δ pgm штаммы *Y. pestis* в присутствии декстрана железа могут быть использованы в условиях лаборатории УББ 2 для воспроизведения экспериментальной чумы у мышей с выраженными патологоанатомическими изменениями и летальностью.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, модель экспериментальной чумы, EV НИИЭГ, декстран железа.

Корреспондирующий автор: Вагайская Анастасия Сергеевна, e-mail: Vagaiskaia@obolensk.org.

Для цитирования: Вагайская А.С., Трунякова А.С., Комбарова Т.И., Дентовская С.В. Моделирование экспериментальной чумы в условиях лаборатории уровня биобезопасности 2. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 4:46–53. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-46-53
Поступила 16.06.2021. Отправлена на доработку 30.06.2021. Принята к публ. 19.10.2021.

A.S. Vagaiskaya, A.S. Trunyakova, T.I. Kombarova, S.V. Dentovskaya

Simulation of Bubonic Plague in BSL-2 Laboratory

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

Abstract. The causative agent of plague, *Yersinia pestis*, is classified as pathogenicity (hazard) group I agent, which means that the work with “wild type” strains should be carried out in BSL-3 facilities. *Y. pestis* EV NIEG is a Δ pgm strain, allowing experimental studies to be carried out in BSL-2 laboratories. However, the disease and its progression elicited by such strain do not entirely mirror the infection observed with fully virulent strains. Residual virulence of *Y. pestis* EV NIEG strain for mice can be increased under *in vivo* iron supplementation. **The aim** of the study was to optimize methodological approaches to modeling experimental plague in laboratory animals following administration of attenuated Δ pgm *Y. pestis* strains with iron dextran. **Materials and methods.** Simulation of plague infection in outbred mice was carried out through subcutaneous inoculation of *Y. pestis* EV NIEG strain with iron dextran supplementation. The animal condition was assessed on a daily basis. In the course of the experiment, the pathological presentation and bacterial content in organs of mice were evaluated. **Results and discussion.** Mice inoculated subcutaneously with *Y. pestis* EV NIEG strain in the presence of iron dextran developed a bubonic plague that resulted in lethal outcome with pathological changes of internal organs, characteristic of plague infection. In case of daily administration of iron, LD₅₀ of *Y. pestis* EV NIEG strain for the mice significantly exceeded the same one with a single injection. Differences in the survival rate among animals in the groups with a single and multiple administration of iron compared to the control group were statistically valid. Thus, attenuated Δ pgm *Y. pestis* strains in the presence of iron dextran can be used to model experimental plague in mice with marked pathological changes and lethality in BSL-2 laboratories.

Key words: *Yersinia pestis*, experimental plague model, EV NIEG, iron dextran.

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

Corresponding author: Anastasiya S. Vagaiskaya, e-mail: Vagaiskaia@obolensk.org.

Citation: Vagaiskaya A.S., Trunyakova A.S., Kombarova T.I., Dentovskaya S.V. Simulation of Bubonic Plague in BSL-2 Laboratory. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2021; 4:46–53. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-46-53

Received 16.06.2021. Revised 30.06.2021. Accepted 19.10.2021.

Vagaiskaya A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7280-3660>
Trunyakova A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9223-2105>

Kombarova T.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1959-1739>
Dentovskaya S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1996-8949>

Чума – острая инфекционная болезнь, характеризующаяся явлениями тяжелой общей интоксикации, воспалительными процессами в лимфатических узлах, легких и других органах, – признана в настоящее время «возвращающейся» инфекцией, а ее возбудитель, *Yersinia pestis*, может быть использован в качестве агента биотерроризма [1]. Поиски «идеальной» вакцины против чумы продолжаются. *Y. pestis* относят к I группе патогенности (биологической опасности), что подразумевает при проведении работ соблюдение санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, направленных на обеспечение личной и общественной безопасности и защиту окружающей среды. Одним из основных препятствий при изучении биологии *Y. pestis* и патогенеза чумы является то, что многие лаборатории не имеют доступа к необходимым для работы с такими патогенами помещениям 3-го уровня биобезопасности (УББ 3) и поэтому должны работать с аттенуированными штаммами чумного микроба.

Важным этапом в процессе создания вакцинных препаратов является демонстрация защитной эффективности, обычно включающая заражение вакцинированных и контрольных интактных животных вирулентными штаммами, воспроизводящими заболевание. На ранних стадиях разработки, когда перспективные вакцины-кандидаты должны быть первоначально охарактеризованы и доработаны, риск и сложность, связанные с использованием вирулентных тест-заражающих штаммов при оценке протективности на модели животных, могут быть снижены за счет воспроизведения чумной инфекции в условиях УББ 2, а не УББ 3 лаборатории с использованием стандартных аттенуированных штаммов.

Аттенуированные (авирулентные) штаммы чумного микроба, относящиеся к III группе патогенности согласно СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности», обычно не обладающие либо хромосомным локусом пигментации (*pgm*), основным компонентом которого является иерсиниабактин-зависимая система транспорта железа (*ybt*), необходимая для проявления вирулентности штаммов чумного микроба при интрадермальном введении, либо плазмидой кальцийзависимости (*pCad*, *pYV*, *pCD1*), более безопасны при манипуляциях, что позволяет проводить экспериментальные исследования в лабораториях уровня УББ 2 [2].

Морбиторы – это вещества (дефибринированная кровь барана, сульфат железа, декстран железа и др.), повышающие содержание ионов железа в крови и способствующие эффективному развитию сепсиса и гибели лабораторных животных при введении

аттенуированных *Δpgm* штаммов чумного микроба. Показано, что введение мышам сульфата железа может нивелировать потребность в продуктах локуса иерсиниабактина, полностью восстанавливая вирулентность *Δpgm* мутанта *Y. pestis*, введенного парентерально [3, 4]. При этом использование подобного подхода для воспроизведения легочной чумы после интраназального введения штамма KIMD27 не было успешным [5]. М.А. Parent *et al.* [6] показали токсичность хлорида железа, ограничив дозу введения до 0,5 мг/мышь, что согласуется с ранее полученными данными о токсичности неорганического железа в концентрациях 30–60 мг/кг.

Токсичность неорганического железа и потребность в его парентеральном введении при лечении различных заболеваний привели к появлению более безопасных коллоидных растворов гидроксида железа, стабилизированных различными полисахаридами [7]. Подкожное введение мышам штамма *Y. pestis*, дефектного по области пигментсорбции *pgm*, с добавлением коллоидного раствора хондроитин сульфата железа приводило к смерти животных с гистологическими изменениями в печени и селезенке, напоминающими те, что возникают в результате инфицирования вирулентным штаммом [8]. В дальнейшем миллиграммовые дозы коллоидного декстрана железа начали использовать при воспроизведении моделей других бактериальных инфекций [9–11]. Е.М. Galván *et al.* [12] описали УББ 2 модель легочной чумы у мышей, основанную на внутрибрюшинном введении коллоидного декстрана железа, применение которого позволяет избежать возникновения проблем токсичности и использовать благоприятные преимущества фармакокинетики, такие как более низкий клиренс и более длительный период полувыведения, чем у других коллоидных или неорганических препаратов железа [7]. В доступной литературе отсутствуют данные об использовании железа (III) гидроксид декстрана для воспроизведения бубонной чумы у мышей, обусловленной введением *Δpgm* штаммов *Y. pestis*. Кроме того, не описано течение инфекции у животных при разных режимах введения данного препарата железа.

В настоящей работе мы оптимизировали методический прием моделирования бубонной чумы у лабораторных животных после подкожного введения аттенуированного *Δpgm* штамма *Y. pestis* с использованием декстрана железа с целью оценки протективности кандидатных вакцин на ранних стадиях разработки. Предлагаемая к использованию модель является безопасным инструментом идентификации наиболее многообещающих кандидатных препаратов, защитный потенциал которых впоследствии

может быть оценен с использованием вирулентных штаммов чумного микроба.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» выращивали на питательной среде на основе сердечно-мозговой вытяжки – ВНИ (Brain Heart Infusion производства HiMedia, Индия) pH (7,2±0,1) с добавлением 1 % гемолизированной крови в течение 48 ч при температуре (28±1) °С. Бактериальную суспензию готовили в 0,9 % растворе натрия хлорида по ОСО мутности 10 МЕ, концентрацию контролировали путем посева. Все работы осуществляли в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Определение вирулентности проводили на 6–8-недельных самцах беспородных мышей 18–20 г в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Протокол экспериментов с животными одобрен комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ (ВП – 2019/4 от 05.12.2019). Мышам подкожно вводили суспензию двухсуточной агаровой культуры *Y. pestis* EV НИИЭГ в изотоническом растворе NaCl в разведениях с 10 по 10⁵ КОЕ в объеме 0,2 мл на животное. Погибших животных вскрывали, внутренние органы (селезенку, регионарные лимфоузлы) подвергали бактериологическому исследованию. В ходе эксперимента по моделированию чумной инфекции все животные были разделены на четыре группы. Первая группа состояла из мышей, которым однократно внутрибрюшинно вводили 4 мг декстрана железа (раствор для внутримышечного введения «Феррум Лек» 50 мг/мл, Словения) за 1 ч до инокуляции штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Во второй группе были мыши, которым вводили препарат железа в той же дозе ежедневно. Мышам третьей группы вводили только штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, а животным четвертой группы – только декстран железа.

Оценку здоровья проводили ежедневно. Активность, внешний вид, признаки обезвоживания и потерю веса животных оценивали по шкале от 1 до 4 баллов. Все работы с животными велись в соответствии с этическими нормами.

Статистический анализ. Вычисление величин LD₅₀ проводили по методу Kärber в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [13]. Данные представляли как среднее значение ± стандартное отклонение. Для статистического анализа использовали Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Software, La Jolla, CA), выполняя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Различия считали достоверными при p≤0,05.

Результаты и обсуждение

Влияние железа на остаточную вирулентность Δpgm штаммов *Y. pestis*. Ранее проведенные исследования показали, что аттенуированные Δpgm штаммы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, не обладающие способностью получать железо из биологических жидкостей, восстанавливают вирулентность для мышей и морских свинок при парентеральном введении гема или неорганического железа перед заражением [3, 14]. Для создания воспроизводимой модели бубонной чумы исследовали изменение остаточной вирулентности Δpgm штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для мышей при совместном введении с декстраном железа. Развитие заболевания и выживаемость животных при подкожном введении штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в концентрациях от 10 до 10⁵ КОЕ изучили при однократной и ежедневных инъекциях декстрана Fe(OH)₃ в дозе 4 мг, так как более высокие концентрации могут проявлять токсический эффект [15]. Мыши контрольных групп получили или только штамм чумного микроба, или только препарат железа.

После подкожного введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в дозах 10–10⁴ КОЕ наряду с однократной внутрибрюшинной инъекцией раствора «Феррум Лек» мыши оставались живы на протяжении всего эксперимента (рис. 1), при дозе 10⁵ КОЕ четыре из пяти животных пали к восьмым суткам наблюдения. При ежедневном введении декстрана Fe(OH)₃ гибель животных наблюдали при всех использованных дозах штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ со 100 % смертностью в дозах 10³–10⁵ КОЕ. Животные контрольных групп, получившие только препарат железа или только штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, оставались здоровыми.

LD₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ при ежедневном введении беспородным мышам декстрана Fe(OH)₃ достоверно превышала аналогичный показатель при однократном введении препарата (p=0,0086). Различия в выживаемости животных в группах как с однократным (p=0,003), так и с ежедневным (p=0,0001) введением железа по сравнению с контролем были достоверны (рис. 1, таблица).

В последующем оценку физического здоровья, патологоанатомических изменений и обсемененности внутренних органов мышей проводили для дозы 10⁵ КОЕ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Характеристика заболевания. Для установления особенностей заболевания ежедневно в течение всего эксперимента контролировали состояние здоровья и массу тела беспородных мышей из всех экспериментальных групп. Признаки заболевания: снижение активности, обезвоживание и взъерошенность шерсти – стали появляться на третьи сутки у мышей при ежедневном введении декстрана железа, при однократном – только на четвертые. Животные контрольных групп не проявляли признаков заболевания. Снижение веса наблюдали в первых двух

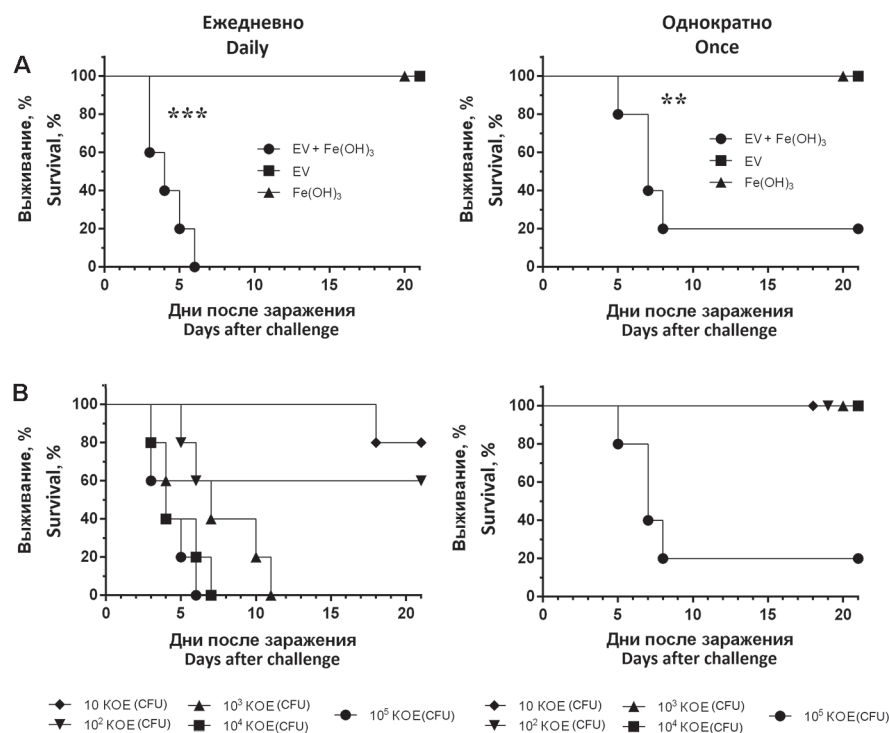


Рис. 1. Выживаемость беспородных мышей после подкожного введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ при добавлении железа:

А – кривые выживания при дозе 10⁵ КОЕ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ; В – кривые выживания при введении разных доз штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. ** p≤0,01; *** p≤0,001

Fig. 1. Mice survival rate after subcutaneous administration of *Y. pestis* EV NIEG strain supplemented with iron:

А – survival curves at an infecting dose of 10⁵ CFU of the *Y. pestis* EV NIEG; В – survival curves at different doses of the *Y. pestis* EV NIEG. ** p≤0,01; *** p≤0,001

группах, при этом во второй группе снижение было более прогрессирующим. В двух оставшихся группах вес мышей не снижался (рис. 2). У животных первых двух групп, получивших штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ с добавлением декстрана железа, заболевание прогрессировало, пока мыши не пали, в то время как контрольные мыши оставались здоровыми.

Для оценки патологоанатомических изменений павших мышей из первой и второй групп подвергали вскрытию. Мышей из контрольных групп вскрывали ежедневно (рис. 3). У павших мышей из первой группы наблюдали формирование бубона в месте введения, геморрагию в подкожной клетчатке в виде характерных для чумы разлитых кровоизлияний, занимающих весь бок животного, а также увеличение селезенки с характерными очагами некроза. Патологоанатомические изменения у мышей из вто-

рой группы включали образование бубонов в паховых лимфатических узлах (регионарном и контралатеральном), увеличение и кровенаполнение печени, незначительное увеличение в размерах, «дряблость» селезенки. Подкожная клетчатка животных окрашена в оранжевый цвет как следствие ежедневного введения железа. У мышей из третьей группы отмечали увеличение селезенки, не отражающееся на общем состоянии здоровья. У мышей, получавших только препарат железа, наблюдали изменение цвета подкожной клетчатки, изменения тканей и внутренних органов отсутствовали.

Распространение по органам. Диссеминацию чумного микроба изучили при ежедневном и однократном введении препарата железа (рис. 4). В первые дни после введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ наряду с однократной инъекцией железа большая

Влияние декстрана железа на остаточную вирулентность штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для беспородных мышей

The effect of iron dextran on the residual virulence of *Y. pestis* EV NIEG strain for outbred mice

Штамм Strain	Декстран железа, 4 мг Iron dextran, 4 mg	LD ₅₀ , КОЕ* LD ₅₀ , CFU*	Доза, КОЕ Dose, CFU	Средние сроки жизни, сутки Average survival time, days
<i>Y. pestis</i> EV NIEG	однократно once	50119 (19953÷794328)	10–10 ⁴	>21
			10 ⁵	5,4±1,3
	ежедневно daily	79 (20÷316)	10	18
			10 ²	5,5±0,7
			10 ³	7±3,5
			10 ⁴	4,8±1,6
<i>Y. pestis</i> 231	–	3 (1÷12)	10–10 ⁴	5,4±0,5

Примечание: * – 95 % доверительный интервал представлен в круглых скобках.

Notes: * – 95 % confidence interval is shown in parentheses.

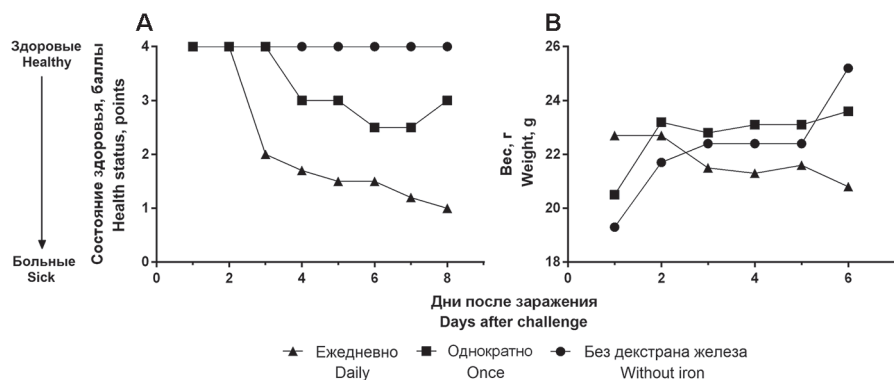


Рис. 2. Оценка физического здоровья мышей после введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в присутствии железа:

A – показатель здоровья; B – вес

Fig. 2. Physical health assessment of mice after injection with *Y. pestis* EV NIEG strain plus iron:

A – an indicator of health; B – weight

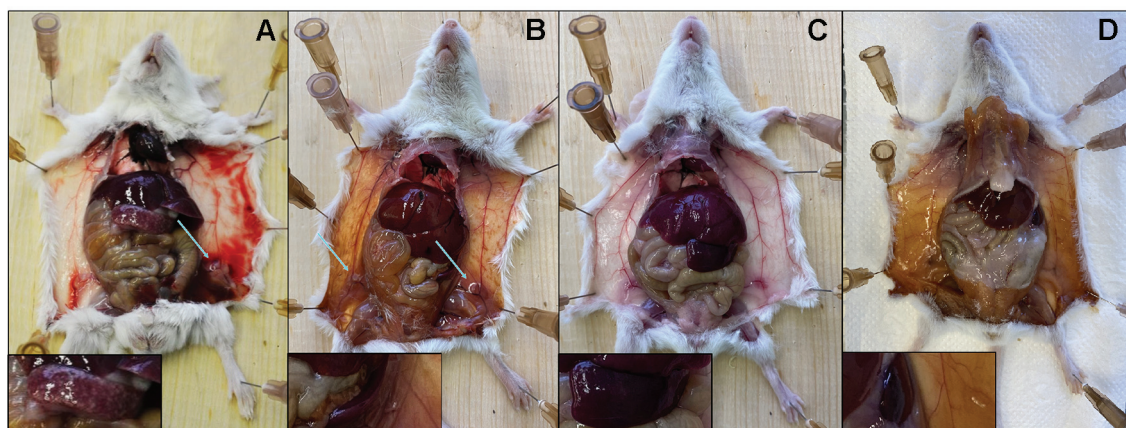


Рис. 3. Патологоанатомические изменения у беспородных мышей при введении декстрана $\text{Fe}(\text{OH})_3$ совместно с *Y. pestis* EV НИИЭГ:

A – однократное введение; B – ежедневное введение; C – контроль после введения только штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ; D – контроль после введения только препарата железа. Стрелками обозначены сформировавшиеся бубоны в лимфатических узлах

Fig. 3. Pathological changes in outbred mice infected with *Y. pestis* EV NIEG strain supplemented with iron dextran $\text{Fe}(\text{OH})_3$:

A – single administration; B – daily administration; C – only *Y. pestis* EV NIEG strain; D – control group that received only iron. Arrows highlight buboes in the lymph nodes

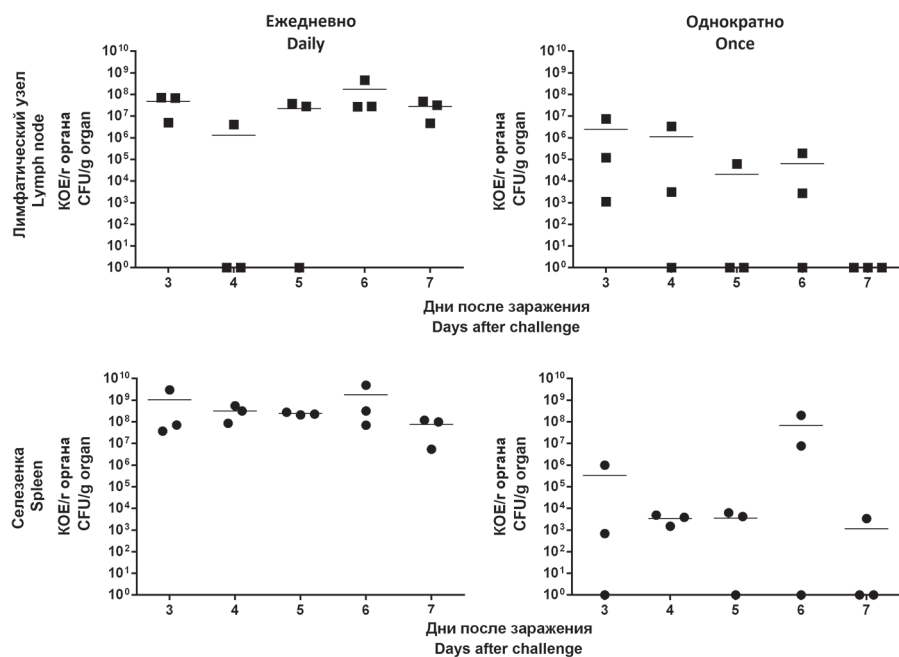


Рис. 4. Бактериальная колонизация внутренних органов беспородных мышей после введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в присутствии железа

Fig. 4. Bacterial colonization of the internal organs of outbred mice infected with *Y. pestis* EV NIEG strain in the presence of iron

часть микроорганизмов находилась в регионарных лимфоузлах с последующим распространением в селезенку, в которой со временем количество бактерий уменьшалось. При ежедневном введении декстрана $\text{Fe}(\text{OH})_3$ наблюдали сохранение высокого уровня бактериальной колонизации регионарных лимфоузлов и селезенки мышей. Селезенки и лимфатические узлы, полученные от мышей из групп контроля, были стерильны (данные не показаны).

Как биологическую модель мышей широко используют для изучения патогенеза инфекции, вызываемой *Y. pestis*, а также для оценки иммуногенности и защитной эффективности кандидатных вакцин против чумы [16–19]. Мыши являются естественными хозяевами чумного микроба, заболевание которых протекает подобно возникающему у инфицированного человека [18]. Эксперименты *in vivo* с использованием высоковирулентных штаммов чумного микроба проводят в соответствии с санитарными правилами СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» уровня УББ 3. Таким образом, лабораторные работы с использованием подобных штаммов сложны, дорогостоящи и сопряжены с риском инфицирования лабораторного персонала.

Аттенуация вакцинного штамма *Y. pestis* EV произошла из-за спонтанной делеции 102-т.п.о. локуса *pgm*, отвечающего за поглощение железа бактерией [20]. Данный штамм относится к III группе патогенности, не подпадает под нормативные требования в отношении вирулентных аналогов и может безопасно использоваться в работе в соответствии с требованиями лаборатории УББ 2.

Согласно МУ 3.3.1.1113-02 «Основные требования отбора новых вакцинных штаммов чумного микроба» подкожное введение штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ не должно вызывать гибель беспородных мышей при введении доз до 10^7 КОЕ. При использовании бактериальной культуры в большей концентрации гибель животных может наступить в первые трое суток после введения вследствие токсического эффекта, обусловленного наличием мышинового токсина Ymt (*Yersinia* mouse toxin, фосфолипаза Д) [21, 22]. Кроме того, установлено, что патологогистологические изменения у мышей после введения штамма *Y. pestis* EV отличаются от наблюдаемого при использовании вирулентных аналогов [2].

Остаточную вирулентность Δpgm штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ можно повысить при одновременном внутрибрюшинном введении животным препаратов железа (так называемая условная вирулентность) без роста риска для исследователей. О влиянии железа на рост и вирулентность Δpgm штаммов *Y. pestis* впервые сообщили Jackson и Burrows в середине 1950-х гг. при изучении механизмов патогенеза чумы [3]. Введение мышам штамма *Y. pestis* KIM, дефектного по локусу *pgm*, с добавлением железа было описано в двух исследованиях [7, 14]. Н. Lee-Lewis *et al.* [5] сообщали о летальной инфекции у мышей

BALB/c после введения штамма KIM D27 в присутствии большого количества неорганического железа (до 500 мкг), введенного внутрибрюшинно. При этом исследователи наблюдали размножение бактерий и повреждение нескольких органов, но не обнаружили признаков пневмонии или поражений, характерных для легочной чумы. Проблема, возникающая при использовании больших доз неорганического железа *in vivo*, – это токсичность. Самая высокая доза FeCl_2 , которую смогли без токсических последствий вводить мышам интраназально, – 40 мкг; большие количества вызывали побочные эффекты, включая сухость глаз, взъерошенность шерсти и сутулость, на устранение которых требовалось 1–3 дня. Эти неспецифические побочные эффекты не только вызывали чрезмерный стресс у животных, но также затрудняли оценку «истинного» заболевания [15]. Использование декстрана железа снижает токсичность из-за более медленного высвобождения из углеводных комплексов, несмотря на необходимость даже больших количеств и многократного введения. Например, в исследовании, описанном Е.М. Galván *et al.* [12], для моделирования легочной чумы мышам ежедневно вводили коллоидный раствор железа за 2–3 ч до и в течение 10 суток после заражения.

В настоящей работе использование декстрана железа однократно или ежедневно при моделировании бубонной чумы позволило повысить остаточную вирулентность аттенуированного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для беспородных мышей. При ежедневном введении препарата железа LD_{50} штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для животных приблизилась к аналогичному показателю штамма «дикого» типа *Y. pestis* 231. Несмотря на достоверность отличий в величинах LD_{50} вакцинного штамма при однократном и ежедневном введении декстрана $\text{Fe}(\text{OH})_3$, средние сроки гибели животных при введении дозы 10^5 КОЕ практически не отличались.

Таким образом, в присутствии внутрибрюшинно вводимого декстрана железа штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ можно использовать для воспроизведения бубонной чумы с выраженными патологоанатомическими изменениями и гибелью мышей в условиях УББ 2. Модель, описанная в настоящем исследовании, не предназначена для замены, а является дополнительным инструментом предварительного тестирования протективности и определения приоритетных потенциальных кандидатов для дальнейшей оценки с использованием вирулентных штаммов чумного микроба. Использование предложенной модели бубонной чумы позволит быстро и безопасно оценить кандидатные препараты и выделить наиболее перспективные для дальнейшего тестирования в условиях УББ 3.

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

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора

на 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней».

Список литературы

1. Gage K.L., Kosoy M.Y. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annu. Rev. Entomol.* 2005; 50:505–28. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130337.
2. Perry R.D., Fetherston J.D. Iron and heme uptake systems. In: Carniel E., Hinnebusch B.J., editors. *Yersinia: Molecular and Cellular Biology*. UK: Horizon Bioscience; 2004. P. 257–83.
3. Burrows T.W., Jackson S. The virulence-enhancing effect of iron on nonpigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1956; 37(6):577–83.
4. Сазанова Е.В., Малахаева А.Н., Малукова Т.А., Бойко А.В., Булгакова Е.Г., Попов Ю.А. Моделирование чумной инфекции при заражении авирулентными штаммами *Yersinia pestis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 2:45–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-45-49.
5. Lee-Lewis H., Anderson D.M. Absence of inflammation and pneumonia during infection with nonpigmented *Yersinia pestis* reveals a new role for the pgm locus in pathogenesis. *Infect. Immun.* 2010; 78(1):220–30. DOI: 10.1128/IAI.00559-09.
6. Parent M.A., Wilhelm L.B., Kummer L.W., Szaba F.M., Mullarky I.K., Smiley S.T. Gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide synthase 2, key elements of cellular immunity, perform critical protective functions during humoral defense against lethal pulmonary *Yersinia pestis* infection. *Infect. Immun.* 2006; 74(6):3381–6. DOI: 10.1128/IAI.00185-06.
7. Denoël P., Godfroid F., Guiso N., Hallander H., Poolman J. Comparison of acellular pertussis vaccines-induced immunity against infection due to *Bordetella pertussis* variant isolates in a mouse model. *Vaccine*. 2005. 23(46-47):5333–41. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.06.021.
8. Wake A., Morita H., Yamamoto M. The effect of an iron drug on host response to experimental plague infection. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 1972. 25(2):75–84. DOI: 10.7883/yoken1952.25.75.
9. Holbein B.E., Jericho K.W., Likes G.C. Neisseria meningitidis infection in mice: influence of iron, variations in virulence among strains, and pathology. *Infect. Immun.* 1979; 24(2):545–51. DOI: 10.1128/iai.24.2.545-551.1979.
10. Starks A.M., Schoeb T.R., Tamplin M.L., Parveen S., Doyle T.J., Bomeisl P.E., Escudero G.M., Gulig P.A. Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infect. Immun.* 2000; 68(10):5785–93. DOI: 10.1128/iai.68.10.5785-5793.2000.
11. Yi K., Stephens D.S., Stojiljkovic I. Development and evaluation of an improved mouse model of meningococcal colonization. *Infect. Immun.* 2003; 71:1849–55. DOI: 10.1128/iai.71.4.1849-1855.2003.
12. Galván E.M., Nair M.K., Chen H., Del P.F., Schifferli D.M. Biosafety level 2 model of pneumonic plague and protection studies with F1 and Psa. *Infect. Immun.* 2010; 78(8):3443–53. DOI: 10.1128/IAI.00382-10.
13. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград: Медгиз [Ленингр. отд-ние]; 1962. 180 с.
14. Ivanov M.I., Noel B.L., Rampersaud R., Mena P., Benach J.L., Bliska J.B. Vaccination of mice with a Yop translocon complex elicits antibodies that are protective against infection with F1-*Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 2008; 76(11):5181–90. DOI: 10.1128/IAI.00189-08.
15. Mellado-Sanchez G., Ramirez K., Drachenberg C.B., Diaz-McNair J., Rodriguez A.L., Galen J.E., Nataro J.P., Pasetti M.F. Characterization of systemic and pneumonic murine models of plague infection using a conditionally virulent strain. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 36(2):113–28. DOI: 10.1016/j.cimid.2012.10.005.
16. Rosenzweig J.A., Jejelowo O., Sha J., Erova T.E., Brackman S.M., Kirtley M.L., van Lier C.J., Chopra A.K. Progress on plague vaccine development. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011; 91(2):265–86. DOI: 10.1007/s00253-011-3380-6.
17. Bubeck S.S., Cantwell A.M., Dube P.H. Delayed inflammatory response to primary pneumonic plague occurs in both outbred and inbred mice. *Infect. Immun.* 2007; 75(2):697–705. DOI: 10.1128/IAI.00403-06.
18. Latham W.W., Crosby S.D., Miller V.L., Goldman W.E. Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005; 102(49):17786–91. DOI: 10.1073/pnas.0506840102.
19. Agar S.L., Sha J., Foltz S.M., Erova T.E., Walberg K.G., Parham T.E., Baze W.B., Suarez G., Peterson J.W., Chopra A.K. Characterization of a mouse model of plague after aerosolization of *Yersinia pestis* CO92. *Microbiology (Reading)*. 2008; 154(Pt 7):1939–48. DOI: 10.1099/mic.0.2008/017335-0.
20. Fetherston J.D., Kirillina O., Bobrov A.G., Paulley J.T., Perry R.D. The yersiniabactin transport system is critical for the pathogenesis of bubonic and pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2010; 78(5):2045–52. DOI: 10.1128/IAI.01236-09.
21. Hinnebusch J., Cherepanov P., Du Y., Rudolph A., Dixon J.D., Schwan T., Forsberg A. Murine toxin of *Yersinia pestis* shows phospholipase D activity but is not required for virulence in mice. *Int. J. Med. Microbiol.* 2000; 290(4-5):483–7. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80070-3.
22. Fan Y., Zhou Y., Feng N., Wang Q., Tian G., Wu X., Liu Z., Bi Y., Yang R., Wang X. Recombinant murine toxin from *Yersinia pestis* shows high toxicity and β -adrenergic blocking activity in mice. *Microbes Infect.* 2016; 18(5):329–35. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.01.001.

References

1. Gage K.L., Kosoy M.Y. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annu. Rev. Entomol.* 2005; 50:505–28. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130337.
2. Perry R.D., Fetherston J.D. Iron and heme uptake systems. In: Carniel E., Hinnebusch B.J., editors. *Yersinia: Molecular and Cellular Biology*. UK: Horizon Bioscience; 2004. P. 257–83.
3. Burrows T.W., Jackson S. The virulence-enhancing effect of iron on nonpigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1956; 37(6):577–83.
4. Sazanava E.V., Malakhaeva A.N., Malyukova T.A., Boiko A.V., Bulgakova E.G., Popov Yu.A. Plague infection simulating in case of inoculation with avirulent *Yersinia pestis* strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (2):45–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-45-49.
5. Lee-Lewis H., Anderson D.M. Absence of inflammation and pneumonia during infection with nonpigmented *Yersinia pestis* reveals a new role for the pgm locus in pathogenesis. *Infect. Immun.* 2010; 78(1):220–30. DOI: 10.1128/IAI.00559-09.
6. Parent M.A., Wilhelm L.B., Kummer L.W., Szaba F.M., Mullarky I.K., Smiley S.T. Gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide synthase 2, key elements of cellular immunity, perform critical protective functions during humoral defense against lethal pulmonary *Yersinia pestis* infection. *Infect. Immun.* 2006; 74(6):3381–6. DOI: 10.1128/IAI.00185-06.
7. Denoël P., Godfroid F., Guiso N., Hallander H., Poolman J. Comparison of acellular pertussis vaccines-induced immunity against infection due to *Bordetella pertussis* variant isolates in a mouse model. *Vaccine*. 2005. 23(46-47):5333–41. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.06.021.
8. Wake A., Morita H., Yamamoto M. The effect of an iron drug on host response to experimental plague infection. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 1972. 25(2):75–84. DOI: 10.7883/yoken1952.25.75.
9. Holbein B.E., Jericho K.W., Likes G.C. Neisseria meningitidis infection in mice: influence of iron, variations in virulence among strains, and pathology. *Infect. Immun.* 1979; 24(2):545–51. DOI: 10.1128/iai.24.2.545-551.1979.
10. Starks A.M., Schoeb T.R., Tamplin M.L., Parveen S., Doyle T.J., Bomeisl P.E., Escudero G.M., Gulig P.A. Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infect. Immun.* 2000; 68(10):5785–93. DOI: 10.1128/iai.68.10.5785-5793.2000.
11. Yi K., Stephens D.S., Stojiljkovic I. Development and evaluation of an improved mouse model of meningococcal colonization. *Infect. Immun.* 2003; 71:1849–55. DOI: 10.1128/iai.71.4.1849-1855.2003.
12. Galván E.M., Nair M.K., Chen H., Del P.F., Schifferli D.M. Biosafety level 2 model of pneumonic plague and protection studies with F1 and Psa. *Infect. Immun.* 2010; 78(8):3443–53. DOI: 10.1128/IAI.00382-10.
13. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Research]. Leningrad: "Medgiz" [Leningrad office]; 1962. 180 p.
14. Ivanov M.I., Noel B.L., Rampersaud R., Mena P., Benach J.L., Bliska J.B. Vaccination of mice with a Yop translocon complex elicits antibodies that are protective against infection with F1-*Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 2008; 76(11):5181–90. DOI: 10.1128/IAI.00189-08.
15. Mellado-Sanchez G., Ramirez K., Drachenberg C.B., Diaz-McNair J., Rodriguez A.L., Galen J.E., Nataro J.P., Pasetti M.F. Characterization of systemic and pneumonic murine models of plague infection using a conditionally virulent strain. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 36(2):113–28. DOI: 10.1016/j.cimid.2012.10.005.
16. Rosenzweig J.A., Jejelowo O., Sha J., Erova T.E., Brackman S.M., Kirtley M.L., van Lier C.J., Chopra A.K. Progress on plague vaccine development. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011; 91(2):265–86. DOI: 10.1007/s00253-011-3380-6.

17. Bubeck S.S., Cantwell A.M., Dube P.H. Delayed inflammatory response to primary pneumonic plague occurs in both outbred and inbred mice. *Infect. Immun.* 2007; 75(2):697–705. DOI: 10.1128/IAI.00403-06.
18. Lathem W.W., Crosby S.D., Miller V.L., Goldman W.E. Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005; 102(49):17786–91. DOI: 10.1073/pnas.0506840102.
19. Agar S.L., Sha J., Foltz S.M., Erova T.E., Walberg K.G., Parham T.E., Baze W.B., Suarez G., Peterson J.W., Chopra A.K. Characterization of a mouse model of plague after aerosolization of *Yersinia pestis* CO92. *Microbiology (Reading)*. 2008; 154(Pt 7):1939–48. DOI: 10.1099/mic.0.2008/017335-0.
20. Fetherston J.D., Kirillina O., Bobrov A.G., Paulley J.T., Perry R.D. The yersiniabactin transport system is critical for the pathogenesis of bubonic and pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2010; 78(5):2045–52. DOI: 10.1128/IAI.01236-09.
21. Hinnebusch J., Cherepanov P., Du Y., Rudolph A., Dixon J.D., Schwan T., Forsberg A. Murine toxin of *Yersinia pestis* shows phospholipase D activity but is not required for virulence in mice. *Int. J. Med. Microbiol.* 2000; 290(4-5):483–7. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80070-3.
22. Fan Y., Zhou Y., Feng N., Wang Q., Tian G., Wu X., Liu Z., Bi Y., Yang R., Wang X. Recombinant murine toxin from *Yersinia pestis* shows high toxicity and β -adrenergic blocking activity in mice. *Microbes Infect.* 2016; 18(5):329–35. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.01.001.

Authors:

Vagaiskaya A.S., Trunyakova A.S., Kombarova T.I., Dentovskaya S.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Об авторах:

Вагайская А.С., Трунякова А.С., Комбарова Т.И., Дентовская С.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., р.п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-54-61

УДК 616.993(470.63)

Н.Ф. Василенко, Д.А. Прислегина, Н.В. Цапко, А.С. Волынкина, О.В. Семенко, У.М. Ашибок, Ю.М. Тохов, О.В. Малецкая, А.Н. Куличенко

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ИХ РОЛЬ В ПОДДЕРЖАНИИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЗООНОЗОВ НА ТЕРРИТОРИИ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ

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

Цель исследования – изучение современного состояния популяций позвоночных животных и определение их роли в поддержании природных очагов зоонозов на территории Ставропольского края в 2015–2019 гг. **Материалы и методы.** Проведены лабораторные исследования суспензий органов и проб крови мелких млекопитающих и птиц с помощью сертифицированных диагностических тест-систем для выявления маркеров возбудителей Крымской геморрагической лихорадки, лихорадки Западного Нила, геморрагической лихорадки с почечным синдромом, туляремии, лептоспироза. Статистическую обработку материала проводили по методу Уилсона. **Результаты и обсуждение.** Определены основные резервуары возбудителей природно-очаговых инфекций на территории Ставропольского края на современном этапе: для возбудителя ЛЗН – это птицы, возбудителя КГЛ – млекопитающие и птицы, обитающие в районах полупустынной ландшафтно-географической зоны. Основным природным резервуаром ортохантавирусов на территории Ставропольского края – обыкновенная полевка *Microtus arvalis*, обитающая во всех ландшафтно-географических зонах края. Циркуляция возбудителей туляремии и лептоспироза установлена на всей территории края, их основным природным резервуаром является малая лесная мышь *Sylvaeus uralensis*. Показана необходимость дальнейшего проведения эпизоотологического мониторинга территории края с целью выявления биocenотических закономерностей существования возбудителей, а также причин, определяющих динамику эпизоотического процесса и эпидемического проявления природных очагов. Целесообразно определить точки долговременного наблюдения за численностью носителей и переносчиков природно-очаговых инфекций; усилить эпизоотологический контроль за территорией, особенно в периоды сезонной активности носителей и переносчиков природно-очаговых инфекций.

Ключевые слова: природный резервуар инфекции, позвоночные животные, Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Западного Нила, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, туляремия, лептоспироз, эпизоотологический мониторинг, Ставропольский край.

Корреспондирующий автор: Василенко Надежда Филипповна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Василенко Н.Ф., Прислегина Д.А., Цапко Н.В., Волынкина А.С., Семенко О.В., Ашибок У.М., Тохов Ю.М., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Современное состояние популяций позвоночных животных и их роль в поддержании природных очагов зоонозов на территории Ставропольского края. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 4:54–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-54-61

Поступила 17.12.2020. Отправлена на доработку 20.01.2021. Принята к публ. 04.02.2021.

N.F. Vasilenko, D.A. Prislegina, N.V. Tsapko, A.S. Volynkina, O.V. Semenko, U.M. Ashibokov, Yu.M. Tokhov, O.V. Maletskaya, A.N. Kulichenko

The Current State of the Vertebrate Animals Populations and their Role in the Persistence of Natural Zoonoses Foci in the Stavropol Territory

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to investigate the current state of vertebrates populations and to determine their role in maintaining natural foci of zoonoses in the Stavropol Territory in 2015–2019. **Material and methods.** Organ suspensions and blood samples from small mammals and birds were studied using certified diagnostic test-systems for the markers of Crimean hemorrhagic fever, West Nile fever, hemorrhagic fever with renal syndrome, tularemia, and leptospirosis pathogens. The data were statistically processed using Wilson's method. **Results and discussion.** Identified have been the main reservoirs of natural-focal infections in the Stavropol Territory at the present stage: birds – for the West Nile fever virus, mammals and birds inhabiting the areas of semi-desert landscape-geographical zone – for Crimean hemorrhagic fever agent. The main natural reservoir of orthohantaviruses in the Stavropol Territory is the common vole *Microtus arvalis*, which lives in all landscape-geographical zones. The circulation of tularemia and leptospirosis pathogens has been established throughout the whole territory of the region, the small wood mouse *Sylvaeus uralensis* is of the greatest epizootic significance. Findings indicate the need for further epizootiologic monitoring of Stavropol Territory in order to identify the biocenotic patterns of the pathogens' existence and the reasons that determine the dynamics of the epizootic process and epidemic manifestations of natural foci. It is advisable to determine the sites of long-term monitoring over the number of carriers and vectors of natural-focal infections and strengthen the epizootiologic control over the territory, especially during periods of seasonal activity in carriers and vectors of natural focal infections.

Key words: natural reservoir of infection, vertebrates, Crimean hemorrhagic fever, West Nile fever, hemorrhagic fever with renal syndrome, tularemia, leptospirosis, epizootiologic monitoring, Stavropol Territory.

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

Corresponding author: Nadezhda F. Vasilenko, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Citation: Vasilenko N.F., Prisleghina D.A., Tsapko N.V., Volynkina A.S., Semenko O.V., Ashibokov U.M., Tokhov Yu.M., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. The Current State of the Vertebrate Animals Populations and their Role in the Persistence of Natural Zoonoses Foci in the Stavropol Territory. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2021; 4:54–61. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-54-61

Received 17.12.2020. Revised 20.01.2021. Accepted 04.02.2021.

Vasilenko N.F., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7054-1302>
Prisleghina D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9522-129X>
Tsapko N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5771-2808>
Volynkina A.S., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5554-5882>

Semenko O.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6018-3262>
Ashibokov U.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-91-97-588>
Maletskaya O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3003-4952>
Kulichenko A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Ставропольский край расположен на перешейке между Черным и Каспийским морями в центре Северного Кавказа, административно входит в Северо-Кавказский федеральный округ Российской Федерации.

Большая часть края представлена степными ландшафтами, которые расположены в западных, северных и восточных районах. Полупустынные ландшафты занимают узкую полосу, примыкающую к Кумо-Манычской впадине в пределах Апанасенковского, Туркменского, Арзгирского районов, а также Терско-Кумское междуречье в пределах Левокумского, Нефтекумского и большей части Курского районов. Лесостепные ландшафты региона занимают наиболее приподнятые части Ставропольской возвышенности в пределах Шпаковского, Грачевского, Александровского, части Изобильненского и Петровского районов. Значительная территория лесостепной зоны распахана и используется под посевы зерновых. Предгорные ландшафты занимают южные районы края в пределах Предгорного, части Минераловодского и Георгиевского районов и представляют собой переходную зону от равнин Предкавказья к горным склонам Большого Кавказа [1].

Географическое положение, рельеф, природно-климатические условия, ландшафтное многообразие определили видовое богатство животного мира Ставропольского края. Здесь обитают животные с различными экологическими требованиями к условиям существования: от экстремальной полупустынной зоны до предгорий Кавказа.

Природно-очаговые инфекции (ПОИ) характеризуются способностью возбудителей длительное время сохраняться в окружающей среде на отдельных территориях: в природных очагах, организмах животных, в том числе грызунов, птиц, кровососущих членистоногих, которые являются источниками и переносчиками возбудителей указанных инфекций.

С 2009 г. в Ставропольском крае ежегодно проводится эпизоотологический мониторинг ПОИ, отмечается неустойчивая эпидемиолого-эпизоотологическая обстановка, что связано как с естественной циклической активизацией эпизоотических процессов, так и с ростом масштабов и интенсивности производственных и рекреационных контактов населения с природными очагами [2, 3]. Роль млекопитающих и птиц в поддержании природных очагов зоонозов широко отражена в научных работах и зарубежных авторов [4, 5].

В последние годы отмечаются довольно активные миграционные процессы населения и вселение

в различные зоны природных очагов людей без иммунитета, регистрируются вспышки не только широко распространенных, но и редких в прошлом инфекционных болезней. Кроме того, отмечаются интенсивные эпизоотии относительно новых инфекций [6]. В связи с этим цель данного исследования имеет особую актуальность.

Цель исследования – изучение современного состояния популяций позвоночных животных и определение их роли в поддержании природных очагов зоонозов на территории Ставропольского края в 2015–2019 гг.

Материалы и методы

Отловы мелких млекопитающих и птиц проводили на всей территории Ставропольского края в соответствии с требованиями методических указаний «Отлов, учет и прогноз численности мелких млекопитающих и птиц в природных очагах инфекций» (МУ 3.1.1029-01. М.; 2001). Всего за период наблюдений отловлено 2132 особи мелких млекопитающих 15 видов, трупы южного ежа *Erinaceus roumanicus* и зайца-русака *Lepus europaeus* собирали на автодорогах (табл. 1); добыто 384 особи птиц 56 видов. Среди птиц доминировал грач *Corvus frugilegus* (153 особи), более 20 особей составили полевой воробей *Passer montanus* и сорока *Pica pica*; более 10 особей – золотистая щурка *Merops apiaster*, черноголовая чайка *Larus melanocephalus*, сизый голубь *Columba livia*, обыкновенный скворец *Sturnus vulgaris* и большая синица *Parus mayor*; остальные виды – от 1 до 9 особей. На наличие маркеров возбудителя Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ) исследовано 1037 проб органов мелких млекопитающих (ММ) и птиц, лихорадки Западного Нила (ЛЗН) – 1308 проб, геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) – 1600, туляремии – 1437, лептоспироза – 1990 проб (табл. 2).

Лабораторное исследование полевого материала на наличие маркеров вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) (суспензии мозга и печени мелких млекопитающих и птиц) осуществляли методом ПЦР с использованием наборов реагентов «АмплиСенс® ССНФV-FL» для выявления РНК вируса ККГЛ (ЦНИИЭ, Россия). Индикацию РНК вируса Западного Нила (ВЗН) выполняли с помощью диагностической тест-системы «АмплиСенс® WNV-FL» (ЦНИИЭ, Россия). Для индикации ортохантавирусов использовали иммуноферментную тест-систему «Хантагност» (Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов ИПВЭ

Таблица 1 / Table 1

Количество мелких млекопитающих,
добытых на территории Ставропольского края (2015–2019 гг.)
The number of small mammals caught in the Stavropol Territory
(2015–2019)

Вид мелкого млекопитающего Small mammal species	Количество добытых особей Number of caught specimens	Доля от общего числа, % Share in the total number, %
Малая лесная мышь <i>Sylvaeus uralensis</i> Small wood mouse <i>Sylvaeus uralensis</i>	821	38,1
Домовая мышь <i>Mus musculus</i> House mouse <i>Mus musculus</i>	422	19,6
Полевая мышь <i>Apodemus agrarius</i> Field mouse <i>Apodemus agrarius</i>	66	3,1
Степная мышь <i>Sylvaeus witherbyi</i> Steppe mouse <i>Sylvaeus witherbyi</i>	72	3,3
Обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i> Common vole <i>Microtus arvalis</i>	219	10,2
Общественная полевка <i>Microtus socialis</i> Public vole <i>Microtus socialis</i>	286	13,3
Водяная полевка <i>Arvicola amphibius</i> Water vole <i>Arvicola amphibius</i>	47	2,2
Кавказская бурозубка <i>Sorex satunini</i> Caucasian shrew <i>Sorex satunini</i>	11	0,5
Бурозубка Волнухина <i>Sorex volnuchini</i> Shrew Volnukhin <i>Sorex volnuchini</i>	37	1,7
Малая белозубка <i>Crocidura suaveolens</i> Small shrew <i>Crocidura suaveolens</i>	102	4,7
Серая крыса <i>Rattus norvegicus</i> Gray rat <i>Rattus norvegicus</i>	2	0,1
Серый хомячок <i>Cricetulus migratorius</i> Gray hamster <i>Cricetulus migratorius</i>	39	1,8
Обыкновенный хомяк <i>Cricetus cricetus</i> Common hamster <i>Cricetus cricetus</i>	1	0,05
Южный еж <i>Erinaceus roumanicus</i> Southern hedgehog <i>Erinaceus roumanicus</i>	21	1,0
Заяц-русак <i>Lepus europaeus</i> Hare <i>Lepus europaeus</i>	3	0,1
Лесная соня <i>Dryomys nitedula</i> Forest dormouse <i>Dryomys nitedula</i>	3	0,1
Мышь-малютка <i>Micromys minutus</i> Little mouse <i>Micromys minutus</i>	4	0,2
Всего Total	2156	100

им. М.П. Чумакова РАН, Россия) и «ОМ-Скрин-ГЛПС-РВ» – набор реагентов для выявления РНК хантавирусов – возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом (Пуумала, Добрава, Хантаан, Сеул), позволяющий определить каждый из четырех видов рода *Hantavirus* (*Puumala*, *Dobrava*, *Hantaan*, *Seoul*) (ЦНИИЭ, Россия). Маркеры возбудителя туляремии определяли с использованием набора реагентов «АмплиСенс® *F. tularensis* – FRT» (ЦНИИЭ, Россия), диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового жидкого «РНГА-Тул-

Иг-СтавНИПЧИ» и диагностикума эритроцитарного туляремиального антигенного жидкого «РНГА-Тул-Ат-СтавНИПЧИ» производства Ставропольского противочумного института, диагностикума туляремиального цветного сухого производства Иркутского НИПЧИ и биологическим методом. Для индикации возбудителя лептоспироза использовали набор реагентов «АмплиСенс® *Leptospira*-FL» (ЦНИИЭ, Россия), антитела к лептоспирам в капле сухой крови и сыворотке крови ММ выявляли в реакции микроагглютинации (РМА): каждую сыворотку исследовали со всеми референтными штаммами, представляющими серогруппы патогенных лептоспир, циркулирующих в данной местности. При статистической обработке материала рассчитывали долю выявленных маркеров возбудителей природно-очаговых инфекций в каждой выборке, 95 % доверительные интервалы (ДИ) для долей по методу Уилсона.

Результаты и обсуждение

Одной из наиболее значимых природно-очаговых инфекций на территории Ставропольского края является КГЛ, активизация природного очага которой произошла в 1999 г. [7]. В течение последних двадцати лет ежегодно на территории края регистрируются больные этой особо опасной инфекцией, при эпизоотологическом обследовании выявляются маркеры вируса ККГЛ [8].

В результате проведенного в 2015–2019 гг. эпизоотологического мониторинга на территории Ставропольского края установлено, что в природных биотопах доминирующее положение занимает малая лесная мышь *Sylvaeus uralensis*. Общая доля в отловах этого вида достигает 38,1 %. В качестве видов содоминантов отмечены домовая мышь *Mus musculus*, общественная полевка *Microtus socialis* и обыкновенная полевка *Microtus arvalis*.

На наличие маркеров возбудителя КГЛ методом ПЦР исследовано 800 проб суспензий головного мозга и печени мелких млекопитающих и 237 проб птиц. РНК вируса ККГЛ обнаружена в одной пробе зайца-русака *L. europaeus*, в одной пробе южного ежа *E. roumanicus*, в одной пробе обыкновенного скворца *S. vulgaris* и двух пробах грача *C. frugilegus*. Положительные пробы выявлены в Нефтекумском (три) и Апанасенковском (две) районах, расположенных в полупустынной ландшафтной зоне, где ежегодно регистрируются больные КГЛ.

В результате молекулярно-генетических исследований изолятов вируса ККГЛ установлено, что в популяции вируса на территории Ставропольского края циркулируют РНК-изоляты, принадлежащие к генетическим линиям «Европа-1» (99 % изолятов), «Европа-3» (0,7 %) и «Африка-3» (0,4 %). На филогенетических деревьях по участкам S-, M- и L-сегментов генома в пределах генетической линии «Европа-1» РНК-изоляты вируса ККГЛ из Ставропольского края относятся к подгруппам: Va – «Ставрополь – Ростов –

Таблица 2 / Table 2

Выявление маркеров возбудителей природно-очаговых инфекций у позвоночных на территории Ставропольского края (2015–2019 гг.)
Identification of markers of natural focal infections pathogens in vertebrates in the Stavropol Territory (2015–2019)

Год Year	КГЛ CHF			ЛЗН WNF			ГЛПС HFRS			Туляремия Tularemia			Лептоспироз Leptospirosis		
	Всего проб Total number of samples	Положительные пробы Positive samples		Всего проб Total number of samples	Положительные пробы Positive samples		Всего проб Total number of samples	Положительные пробы Positive samples		Всего проб Total number of samples	Положительные пробы Positive samples		Всего проб Total number of samples	Положительные пробы Positive samples	
		абс. abs. number	% per cent		абс. abs. number	% per cent		абс. abs. number	% per cent		абс. abs. number	% per cent		абс. abs. number	% per cent
2015	111	3	2,7 (2,3–2,9)	190	2	1,1 (0,8–1,2)	89	4	4,5 (3,9–4,7)	284	25	8,8 (7,9–9,05)	237	10	4,2 (3,6–4,4)
2016	129	2	1,6 (1,3–1,7)	355	0	0	510	12	2,4	177	14	7,9 (7,1–8,1)	535	12	2,2 (1,8–2,4)
2017	н.и. n.e.			120	0	0	112	0	0	333	18	5,4 (4,7–5,6)	248	11	4,4 (3,8–4,6)
2018	165	0	0	242	11	4,5 (3,9–4,7)	164	3	1,8 (1,4–2)	140	21	15 (13,7–15,1)	391	16	4,1 (3,8–4,3)
2019	632	0	0	401	0	0	725	13	1,8 (1,4–2)	503	44	8,7 (7,8–8,9)	579	1	0,2 (0,1–0,2)
Всего Total	1037	5	0,5 (0,3–0,6)	1308	13	1 (0,7–1,1)	1600	32	2 (1,6–2,2)	1437	122	8,5 (7,6–8,7)	1990	50	2,5 (2,1–2,7)

Примечание: н.и. – пробы от позвоночных не исследовались.

Note: n.e. – samples from vertebrates were not examined; CHF – Crimean hemorrhagic fever; WNF – West Nile fever; HFRS – hemorrhagic fever with renal syndrome.

Астрахань», Vb – «Волгоград – Ростов – Ставрополь», Vc – «Астрахань-2» (на филогенетическом дереве по фрагменту М-сегмента не выделяется) [9].

Больные ЛЗН за последние пять лет зарегистрированы в 2018 г. (два завозных случая из Астраханской области и Республики Калмыкия) и в 2019 г. (два местных случая заражения в Георгиевском районе и два завозных случая из Астраханской области и Краснодарского края).

Известно, что основные переносчики вируса Западного Нила (ВЗН) – орнитофильные комары, однако в эпидемический процесс могут включаться иксодовые и аргасовые клещи. Развитое на территории края скотоводство и другие благоприятные условия природного и антропогенного характера обуславливают высокую численность клещей, преимагинальные фазы которых (личинки и нимфы) кормятся на птицах, мышевидных грызунах, насекомоядных, в связи с чем на любом этапе развития эти особи могут стать векторами для ВЗН.

При исследовании 384 проб головного мозга птиц и 924 проб мелких млекопитающих методом ПЦР РНК вируса ЗН выявлена в 13 пробах, полученных от птиц. Все положительные пробы обнаружены у птиц, добытых на территории районов полупустынной ландшафтной зоны. Более 50 % составили пробы от сороки *P. pica* (Левокумский район). РНК ВЗН выявлена также у грача *C. frugilegus* (четыре пробы, Нефтекумский район), чернолобого сорокопута *Lanius minor* (одна проба) и большого баклана *Phalacrocorax carbo* (одна проба), добытых в Апанасенковском районе. Все пробы от мелких млекопитающих показали отрицательный результат.

На основании результатов молекулярно-генетического анализа изолятов вируса ЗН установлена их принадлежность к генотипу Ia [10]. По данным Е.Л. Субботиной и В.Б. Локтева, это широко распространенный генотип, обнаруживаемый на всех соседних территориях: в Ростовской, Волгоградской, Саратовской областях, Краснодарском крае, Республике Калмыкия, а также в странах Европы [11].

Случаи заболевания ГЛПС в Ставропольском крае за анализируемый период выявлены в 2019 г.: три завозных случая – в Кочубеевском районе (из Республики Татарстан) и один – в Благодарненском районе (больной в течение месяца временно проживал в республиках Татарстан и Башкортостан). Однако почти ежегодно маркеры возбудителя ГЛПС выявляются у мышевидных грызунов (табл. 2).

Исследование суспензий легких мышевидных грызунов на наличие маркеров возбудителя ГЛПС иммунологическим и молекулярно-генетическим методами позволило установить, что основным природным резервуаром ортохантавирусов на территории Ставропольского края является обыкновенная полевка *M. arvalis*, доля положительных проб которой составила 56,3 %. РНК и антиген ортохантавирусов у *M. arvalis* выявлены в четырех районах степной зоны (Ипатовском, Кочубеевском,

Красногвардейском, Труновском), а также в Шпаковском (лесостепная зона) и Предгорном (предгорная зона) районах. Кроме того, маркеры ортохантавирусов обнаружены у малой лесной мыши *S. uralensis* – три пробы в Советском (степная зона), по одной – в Предгорном и Изобильненском районах; общественной полевки *M. socialis* – по две пробы в Шпаковском и Изобильненском районах (лесостепная зона); домовой мыши *M. musculus* – по одной пробе в Красногвардейском и Предгорном районах; по одной пробе водяной полевки *Arvicola amphibius* (Красногвардейский район), полевой мыши *Apodemus agrarius* (Шпаковский) и бурозубки Волнухина *Sorex volnuchini* (Ипатовский район).

Циркуляция возбудителя ГЛПС установлена на территории восьми районов, расположенных в степной (пять), лесостепной (два) и предгорной (один) ландшафтных зонах (рисунок).

Специалистами Ставропольского противочумного института впервые установлена на территории Ставропольского края циркуляция ортохантавируса Тула, обладающего низким патогенным потенциалом для человека [12].

Пробы от мышевидных грызунов на наличие маркеров возбудителя лептоспироза в основном исследовали в реакции микроагглютинации – 1909 проб. Антитела к возбудителю лептоспироза выявлены в 48 пробах. Полученные результаты показали, что основным природным резервуаром является малая лесная мышь *S. uralensis* – 21 (43,8 %) проба. Кроме того, положительные пробы получены от общественной полевки *M. socialis* (14,6 %), домовой мыши *M. musculus* (12,5 %), полевой мыши *A. agrarius* (10,4 %), обыкновенной полевки *M. arvalis* (8,3 %); по две пробы выявлено от лесной сони *Dryomys nitedula* и малой белозубки *Crocidura suaveolens*, по одной пробе – от серого хомячка *Cricetulus migratorius*, а также от южного ежа *E. roumanicus* и мелкого рогатого скота. Методом ПЦР исследовали 80 проб, 16S рРНК возбудителя лептоспироза обнаружена в одной пробе мыши домовой *M. musculus*, отловленной в Шпаковском районе.

Маркеры возбудителя лептоспироза выявлены в 15 районах края, расположенных во всех ландшафтных зонах: в полупустынной зоне – 4 пробы в 3 районах, в степной зоне – 27 проб в 7 районах, в лесостепной зоне – 13 проб в 4 районах, в предгорной зоне – 6 проб в 1 районе (рисунок).

Природный очаг туляремии в Ставропольском крае имеет сложную биоценологическую структуру и находится на территории четырех ландшафтно-географических зон. Ландшафтно-экологические особенности территории обеспечивают разнообразие животного мира. Это относится к грызунам и насекомоядным, большинство из которых имеют значение в сохранении и трансмиссии как возбудителя туляремии, так и ряда других инфекционных заболеваний [13].

В 2015–2019 гг. эпизоотологический мониторинг туляремии проводился на всей территории края в пол-

ном объеме. Лабораторными методами исследовано 1437 проб, в том числе от мелких млекопитающих – 1265 проб, погадок – 172 пробы. Антиген возбудителя туляремии в РНАт выявлен в двух пробах погадок (Андроповский район), в РНГА – в двух пробах погадок домового сыча *Athene noctua*, двух пробах органов малой лесной мыши *S. uralensis* (Шпаковский район), одной пробе южного ежа *E. roumanicus* (Курский район) и одной пробе зайца-русака *L. europaeus* (Апанасенковский район). Антитела к возбудителю туляремии обнаружены в 108 пробах мелких млекопитающих, в том числе: в 43 (35,0 %) пробах от малой лесной мыши *S. uralensis*, 19 – общественной полевки *M. socialis*, 17 – домовой мыши *M. musculus*, 14 – малой белозубки *C. suaveolens*, 9 – серого хомячка *C. migratorius*, 3 – обыкновенной полевки *M. arvalis*, 3 – кавказской бурозубки *Sorex satunini*. Полученные данные свидетельствуют, что основным природным резервуаром возбудителя туляремии является малая лесная мышь *S. uralensis*.

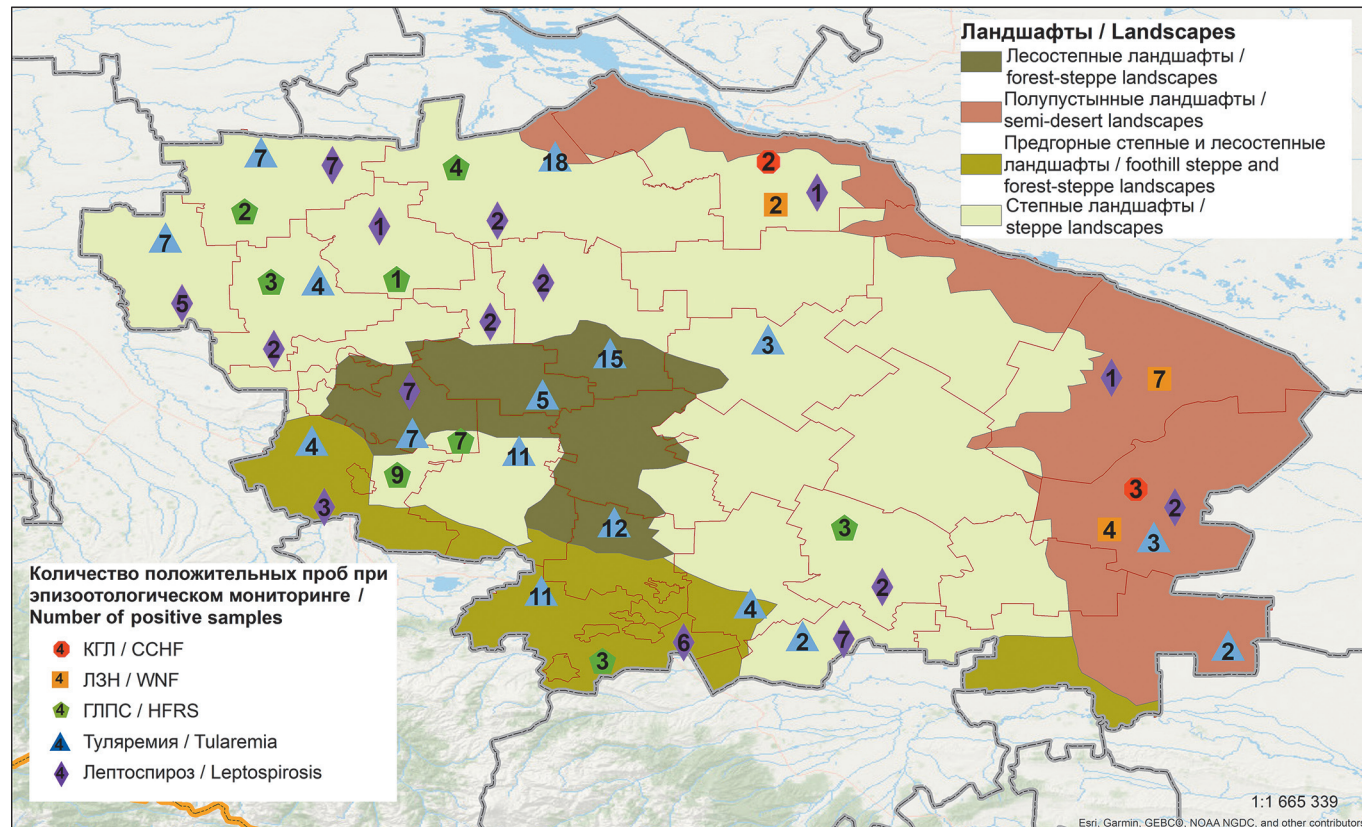
В 2017 г. в Ставропольском крае выявлено 49 случаев заболевания туляремией людей, квалифицированных как вспышка туляремии и преимущественно связанных с охотой на зайцев и пребыванием заболевших лиц в сельской местности на эндемичной территории (43 случая из 49). Вспышке туляремии предшествовала очень высокая (в сравнении со средними многолетними данными) численность мелких мышевидных грызунов в Петровском райо-

не, выявленная при эпизоотологическом мониторинге осенью 2016 г. и давшая основание к неблагоприятному прогнозу по туляремии на осенне-зимний период 2016–2017 гг. Случаи заболевания регистрировались в 8 административных образованиях края, максимальное количество случаев заболевания туляремией выявлено в Петровском и Ипатовском районах – 16 и 17 случаев соответственно [14].

В 2017 г., помимо положительных находок серологическими методами, биологическим методом при исследовании 173 проб органов мышевидных грызунов возбудитель туляремии выделен от общественной полевки *M. socialis* (три пробы в Петровском районе), малой белозубки *C. suaveolens* (по одной пробе в Петровском и Ипатовском районах) и полевой мыши *A. agrarius* (одна проба в Шпаковском районе).

Выполненное MLVA-25-типирование 20 штаммов *Francisella tularensis*, выделенных в феврале – апреле 2017 г. из источников водоснабжения, от грызунов и из проб сена в Петровском, Ипатовском и Шпаковском районах, показало, что исследованные штаммы принадлежали к генетическим группам В.І, В.ІІІ и В.ІІІІ [12].

В целом в изучаемый период (2015–2019 гг.) маркеры возбудителя туляремии выявлены в 17 административных районах (из 26), расположенных во всех ландшафтно-географических зонах: полупустынная зона – 3, степная – 10, лесостепная – 3, предгорная – 1 (рисунок).



Выявление маркеров возбудителей природно-очаговых инфекций у позвоночных на территории Ставропольского края (2015–2019 гг.)

Identification of markers of natural-focal infection pathogens in vertebrates in the Stavropol Territory (2015–2019)

Подведем итоги. Полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что на территории Ставропольского края циркулируют возбудители природно-очаговых инфекций вирусной (Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Западного Нила, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом) и бактериальной (туляремия, лептоспироз) этиологии. Показано, что важную роль в сохранении природных очагов зоонозов играют позвоночные животные.

Маркеры возбудителя КГЛ выявлены у млекопитающих и птиц, являющихся прокормителями основного резервуара и переносчика вируса ККГЛ – клеща *Hyalomma marginatum*, в районах, расположенных в полупустынной зоне.

Основным резервуаром сохранения ВЗН являются птицы, обитающие в районах полупустынной зоны.

Основной природный резервуар ортохантавирусов на территории Ставропольского края – обыкновенная полевка *M. arvalis*, положительные пробы которой составили 56,3 %. Маркеры ортохантавирусов выявлены во всех ландшафтно-географических зонах края.

Также во всех ландшафтно-географических зонах края установлена циркуляция возбудителей лептоспироза и туляремии. Большая часть маркеров возбудителя туляремии и лептоспироза выявлена в районах степной и лесостепной зоны (76,5 и 73,3 % соответственно), наибольшую эпизоотическую значимость представляет малая лесная мышь *S. uralensis*, от которой получено 43,8 % положительных проб на наличие маркеров лептоспироза и 36,9 % – маркеров туляремии.

Таким образом, проведенные нами исследования позволили определить основные резервуары возбудителей природно-очаговых инфекций на территории Ставропольского края на современном этапе: КГЛ, ЛЗН, ГЛПС, туляремии и лептоспироза. Выявление маркеров возбудителей указанных инфекционных болезней у позвоночных животных, уровень численности их носителей в сочетании с оптимальными условиями существования для всех сочленов паразитарных систем свидетельствуют об активности их природных очагов, обладающих определенным эпидпотенциалом. В связи с этим необходимо обеспечить проведение ежегодного комплексного эпизоотологического и энтомологического мониторинга территории края, определив стационарные точки наблюдения. Особый контроль за территорией требуется в периоды сезонной активности носителей и переносчиков зоонозных инфекций. Кроме того, особого внимания требует организация информационно-разъяснительной работы среди населения по вопросам эпидемиологии и профилактики природно-очаговых зоонозных инфекций.

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

Список литературы

1. Шальнев В.А. Эволюция ландшафтов Северного Кавказа. Ставрополь: Изд-во Ставропольского государственного университета; 2007. 309 с.
2. Прислегина Д.А., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Ковальчук И.В. Эпидемиологические особенности природно-очаговых инфекционных болезней в Ставропольском крае в 2015 году. *Здоровье населения и среда обитания*. 2017; 1(286):52–5.
3. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Прислегина Д.А., Манин Е.А., Семенко О.В., Шапошникова Л.И., Волюнкина А.С., Лисицкая Я.В., Таран Т.В., Варфоломеева Н.Г., Герасименко Е.В., Куличенко А.Н. Эпизоотологический мониторинг природно-очаговых инфекций на юге европейской части России в 2017 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 2:45–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-45-49.
4. Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Denys C., Koivogui L., ter Meulen J., Krüger D.H. Hantavirus in African Wood Mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5):838–40. DOI: 10.3201/eid1205.051487.
5. Mourya D.T., Yadav P.D., Shete A.M., Gurav Y.K., Raut C.G., Jadhav R.S., Pawar S.D., Nichol S.T., Mishra A.C. Detection, isolation and confirmation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human, ticks and animals in Ahmadabad, India., 2010–2011. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(5):1653. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001653.
6. Истомин А.В. Региональный мониторинг природно-очаговых инфекций. *Псковский регионологический журнал*. 2006; 1:122–135.
7. Онищенко Г.Г., Айдинов Т.Г., Москвитина Э.А., Ломов Ю.М., Тихонов Н.Г., Прометной В.И., Швагер М.М., Рыжков В.И., Савченко П.П., Дмитриева Т.А., Баташев В.В., Пухов И.М., Пичурина Н.Л., Иванова Н.Г., Гавринов С.А., Ковалев Е.В., Кипайкин В.А., Паук В.Л., Емельянова З.Н., Орехов И.В., Липкович А.Д., Стахеев В.В., Трепель В.Г., Усаткин А.В., Марков В.И., Борисевич И.В., Меркулов В.А., Махлай А.А., Васильев Н.Т., Мишанькин Б.Н., Водопьянов С.О., Мазрухо Т.В., Бадуненко В.П., Айдинов Г.В. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка в Ростовской области: эпидемиологические особенности вспышки. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2000; 2:36–42.
8. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., редакторы. Крымская геморрагическая лихорадка. Воронеж: ООО «Фаворит»; 2018. 288 с.
9. Волюнкина А.С., Куличенко А.Н. Современные методы молекулярно-генетического анализа Крымской геморрагической лихорадки в системе эпидемиологического надзора. *Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение*. 2016; 1(14):53–60.
10. Лисицкая Я.В., Волюнкина А.С., Котенев Е.С., Заревина Л.И., Манин Е.А., Цанко Н.В., Шапошникова Л.И., Белова О.А. Циркуляция вируса Западного Нила на территории Ставропольского края в 2011–2015 гг. *Здоровье населения и среда обитания*. 2017; 12(297):47–50.
11. Субботина Е.Л., Локтев В.Б. Молекулярная эволюция вируса западного Нила. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014; 1:31–7.
12. Чекрыгина Е.В., Волюнкина А.С., Котенев Е.С., Лисицкая Я.В., Гнусарева О.А., Куличенко А.Н. Генетическое профилирование возбудителей природно-очаговых инфекций, циркулирующих на территории Ставропольского края. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 4:81–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-81-88.
13. Левченко Б.И., Дегтярева Л.В., Зайцев А.А., Григорьев М.П., Остапович В.В. Роль отдельных видов мелких млекопитающих в поддержании природной очаговости на территории лесостепной части природного очага туляремии Ставропольского края. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; 3:30–3.

References

1. Shal'nev V.A. [Evolution of the Landscapes of the North Caucasus]. Stavropol: Stavropol State University; 2007. 309 p.
2. Prislekina D.A., Maletskaia O.V., Vasilenko N.F., Manin E.A., Koval'chuk I.V. [Epidemiological features of natural-focal infections in the Stavropol Region in 2015]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2017; 1(286):52–5.
3. Vasilenko N.F., Maletskaia O.V., Prislekina D.A., Manin E.A., Semenko O.V., Shaposhnikova L.I., Volynkina A.S., Lisitskaia Ya.V., Taran T.V., Varfolomeeva N.G., Gerasimenko E.V., Kulichenko A.N. [Epizootiological monitoring of natural-focal infections in the South of the European part of the Russian Federation in 2017]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (2):45–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-45-49.

4. Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Denys C., Koivogui L., ter Meulen J., Krüger D.H. Hantavirus in African Wood Mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5):838–40. DOI: 10.3201/eid1205.051487.
5. Mourya D.T., Yadav P.D., Shete A.M., Gurav Y.K., Raut C.G., Jadhav R.S., Pawar S.D., Nichol S.T., Mishra A.C. Detection, isolation and confirmation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human, ticks and animals in Ahmadabad, India, 2010–2011. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(5):1653. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001653.
6. Istomin A.V. [Regional monitoring of natural-focal infections]. *Pskovsky Regional'ny Zhurnal [Pskov Journal of Regional Studies]*. 2006; 1:122–35.
7. Onishchenko G.G., Aydinov T.G., Moskvitina E.A., Lomov Yu.M., Tikhonov N.G., Prometnoy V.I., Shvager M.M., Ryzhkov V.I., Savchenko P.P., Dmitrieva T.A., Batashev V.V., Pukhov I.M., Pichurina N.L., Ivanova N.G., Gavrinev S.A., Kovalev E.V., Kipaykin V.A., Pauk V.L., Emel'yanova Z.N., Orekhov I.V., Lipkovich A.D., Stakheev V.V., Trepel V.G., Usatkin A.V., Markov V.I., Borisevich I.V., Merkulov V.A., Makhlai A.A., Vasiliev N.T., Mishankin B.N., Vodop'yanov S.O., Mazrukho T.V., Badunenko V.P., Aydinov G.V. [Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Rostov region: epidemiological features of the outbreak]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2000; 2:36–42.
8. Onishchenko G.G., Kulichenko A.N., editors. [Crimean Hemorrhagic Fever]. Voronezh: LLC "Favorit"; 2018. 288 p.
9. Volynkina A.S., Kulichenko A.N. [Modern methods of molecular-genetic analysis in the surveillance of the Crimean-Congo hemorrhagic fever]. *Infektsionnye Bolezni: Novosti. Mneniya. Obuchenie [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2016; 1(14):53–60.
10. Lisitskaya Ya.V., Volynkina A.S., Kotenev E.S., Zarevina L.I., Manin E.A., Tsapko N.V., Shaposhnikova L.I., Belova O.A. [Circulation of West Nile virus in the territory of the Stavropol region in 2011–2015]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2017; 12(297):47–50.
11. Subbotina E.L., Loktev V.B. [Molecular Evolution of the West Nile Virus]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2014; 1:31–7.
12. Chekrygina E.V., Volynkina A.S., Kotenev E.S., Lisitskaya Ya.V., Gnusareva O.A., Kulichenko A.N. [Genetic profiling of the causative agents of natural-focal infections, circulating in the Stavropol Territory]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (4):81–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-81-88.
13. Levchenko B.I., Degtyareva L.V., Zaitsev A.A., Grigor'ev M.P., Ostapovich V.V. [The role of certain species of small mammals in the persistence of natural focal infection in the territory of forest-steppe zone of the natural tularemia focus of the Stavropol region]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2014; (3):30–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-3-30-33.

Authors:

Vasilenko N.F., Prislegina D.A., Tsapko N.V., Volynkina A.S., Semenko O.V., Ashibokov U.M., Tokhov Yu.M., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Об авторах:

Василенко Н.Ф., Прислегина Д.А., Цапко Н.В., Волынкина А.С., Семенко О.В., Ашибокров У.М., Тохов Ю.М., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-62-66

УДК 616.98:579.842.23

В.М. Дубянский¹, А.Х. Халидов²**ЭКОЛОГО-ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ**¹ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация;²ФКУЗ «Дагестанская противочумная станция», Махачкала, Российская Федерация

Принципы дифференциации очагов чумы лежат в основе планирования эпидобследования, прогнозирования эпизоотической активности очагов и, соответственно, достижения высокой эффективности профилактических мероприятий, направленных на предупреждение заболевания людей чумой. Совершенствование дифференциации очагов с учетом современных данных об их состоянии и функционировании является актуальной задачей. **Цель** исследования – дифференциация природных очагов чумы в соответствии со значимостью факторов окружающей среды в динамике их эпизоотической активности. **Материалы и методы.** Использованы модели для прогнозирования эпизоотической активности очагов чумы различных типов, разработанные на основе непрерывной последовательной статистической процедуры распознавания. Изучено 11 очаговых территорий, для которых когда-либо разрабатывались прогностические модели. **Результаты и обсуждение.** Очаги дифференцируются по степени действия биотических и абиотических факторов на эпизоотическую активность. Если для очаговых территорий эпизоотическая активность обусловлена биотическими факторами, возможно прогнозировать эпизоотическую активность только на основании данных, полученных непосредственно при эпизоотологическом обследовании очага чумы. Если эпизоотическая активность обусловлена абиотическими факторами, такие территории могут быть более подвержены влиянию глобальных климатических изменений. Предложенная дифференциация очаговых территорий позволяет искать общие закономерности эпизоотического процесса при чуме в очагах с различными видами носителей, переносчиков, вариантов микроба чумы и географическим расположением, а также использоваться как дополнение к существующей.

Ключевые слова: чума, природный очаг, типизация, экологические факторы.

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

Для цитирования: Дубянский В.М., Халидов А.Х. Эколого-эпизоотологическая дифференциация природных очагов чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:62–66. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-62-66

Поступила 08.07.2021. Отправлена на доработку 22.07.2021. Принята к публ. 27.07.2021.

V.M. Dubyansky¹, A.Kh. Khalidov²**Ecological-Epizootiological Differentiation of Natural Plague Foci**¹Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation;²Dagestan Plague Control Station, Makhachkala, Russian Federation

Abstract. Plague foci differentiation is at the core of surveillance and forecasting of epizootic activity and hence achieving high effectiveness of prophylactic measures for prevention of human plague cases. Improvement of the plague foci differentiation taking into account recent data on their status and functioning is a relevant objective. **The aim** of the study was to differentiate natural plague foci according to the significance of ecology factors in the dynamics of epizootic activity. **Materials and methods.** Various models for forecasting epizootic activity of natural plague foci, based on the consistent statistical pattern recognition procedure were applied. 11 plague focal territories for which predictive models had ever been developed were surveyed. **Results and discussion.** The plague foci differ by impact of biotic and abiotic factors on epizootic activity. If epizootic activity depends on the biotic factors, forecasting can only be made on the basis of the data obtained directly during epizootiological surveillance. If epizootic activity depends on abiotic factors, such plague foci can be more depended on the global climate change. The put forward differentiation of focal areas allows for searching the common patterns of plague epizootic process in foci with different species of hosts and vectors, plague microbe variants and geographic setting, as well as for additional typification alongside the existing ones.

Key words: plague, natural foci, differentiation, ecology factors.

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

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

Citation: Dubyansky V.M., Khalidov A.Kh. Ecological-Epizootiological Differentiation of Natural Plague Foci. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:62–66. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-62-66

Received 08.07.2021. Revised 22.07.2021. Accepted 27.07.2021.

Dubyansky V.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3817-2513>

Чума продолжает оставаться актуальной биологической угрозой в мире [1–3]. Глобальные изменения климата приводят к изменениям границ очаговых территорий [3] и их биоценотической структуры [4]. Принципы типизации очагов чумы лежат в основе планирования эпидобследования, прогно-

зирования эпизоотической активности очагов и, соответственно, достижения высокой эффективности профилактических мероприятий, направленных на предупреждение заболевания людей чумой. Этапы современной типизации очагов чумы, как и критика, подробно приводятся в публикациях многих авто-

ров [5–9]. Практический отход от парадигмы «оздоровления природных очагов» [10] вызывал необходимость дальнейшего совершенствования принципов дифференциации очаговых территорий. Поэтому совершенствование типизации очагов с учетом современных данных об их состоянии и функционировании – достаточно актуальная задача.

За период с 1980 по 2020 год накопилось достаточно данных по прогнозированию эпизоотической активности очагов чумы различных типов на основе многофакторных моделей [11, 12]. Объем данных позволяет оценить значимость факторов окружающей среды в динамике эпизоотической активности различных природных очагов чумы.

Цель исследования – дифференциация природных очагов чумы в соответствии со значимостью факторов окружающей среды в динамике их эпизоотической активности.

Материалы и методы

Материалом послужили опубликованные [11, 12] и неопубликованные, но использованные в научно-исследовательской работе модели для прогнозирования эпизоотической активности очагов

чумы различных типов, разработанные на основе непрерывной последовательной статистической процедуры распознавания [13]. Многофакторные модели построены в виде прогностических таблиц и позволяют изучить информативность биотических и абиотических факторов и показателей, связанных с эпизоотической активностью.

Фактор считается информативным, если он обнаруживает большую степень различия распределений при двух дифференцируемых состояниях объекта исследования. Например, для определенного очага чумы установлено, что попадаемость в ловушки полуденных песчанок предшествующей осенью, равная 2,5 % и более, встречается в два раза чаще перед весенней активизацией эпизоотии, чем при отсутствии активизации. Фактор информативен, так как при достижении указанной численности прогноз на активизацию очага будет выполняться в отношении 2:1.

Информативность фактора выражается в безразмерных числовых значениях, которые тем выше, чем фактор более информативен.

Весь комплекс исследуемых факторов среды представлен в табл. 1. Прогностические модели для каждого очага включают в себя строго специфиче-

Таблица 1 / Table 1

Абиотические и биотические факторы среды, использованные в прогностических моделях эпизоотической активности природных очагов чумы

Biotic and abiotic ecology factors used in the forecasting models of the plague foci epizootic activity

Абиотические факторы Abiotic factors	Биотические факторы Biotic factors
Сумма осадков по месяцам Precipitation by months	Зараженность секторов Infestation of points
ГТК по месяцам Hidrotermic coefficient by months	Прирост зараженности секторов Increase in point infestation
Повторяемость ветров по румбам, по месяцам Repeatability of winds by points, by months	Численность основных носителей Number of main carriers
Среднемесячная температура воздуха по месяцам Average air temperature by months	Зимняя выживаемость основных носителей Survival of main carriers in winter
Число дней без оттепели по месяцам Number of days without thaw by months	Численность второстепенных носителей Number of secondary carriers
Число дней с морозом по месяцам Number of days with frost by months	Численность переносчиков Number of vectors
Влажность воздуха по месяцам Humidity by month	Размножение переносчиков Reproduction of vectors
Число Вольфа по месяцам Wolf number by months	Структура популяции переносчиков Population structure of vectors
Индекс геомагнитной активности по месяцам Index of geomagnetic activity by months	Интенсивность размножения основных носителей Intensity of main carriers breeding
Повторяемость меридионального типа атмосферной циркуляции по месяцам Repeatability of the meridian type of atmospheric circulation by months	
Повторяемость широтного типа атмосферной циркуляции по месяцам Repeatability of the latitudinal type of atmospheric circulation by months	
Повторяемость восточного типа атмосферной циркуляции по месяцам Repeatability of the Eastern type of the atmospheric circulation by months	
Атмосферное давление по месяцам Atmospheric pressure by months	
Количество часов солнечного сияния по месяцам Number of solar hours by months	

ский набор абиотических и биотических факторов среды и их показателей.

Всего изучено 11 очаговых территорий, для которых когда-либо разрабатывались прогностические модели: Центральнo-Кавказский, Восточно-Кавказский высокогорные природные, Дагестанский равнинно-предгорный природный, Прикаспийский песчаный природный очаги. Автономные очаги Среднеазиатского пустынного природного очага: Кызылкумский (ландшафтно-эпизоотологический район [ЛЭР] Северные Кызылкумы, Центральные Кызылкумы), Приаральско-Каракумский, Прибалхашский (ЛЭР Баканасская равнина), Предустюртский, Североприаральский, Зааральский автономные очаги.

Для первых четырех природных очагов и ЛЭР Центральные Кызылкумы Кызылкумского автономного очага прогностические модели создавались для прогноза: ожидается или не ожидается активность очага чумы весной-летом следующего года. Для остальных очаговых территорий прогностические модели создавались для прогноза: превысит или не превысит количество зараженных секторов медианное значение весной.

Прогностические модели для автономных очагов Среднеазиатского пустынного природного очага чумы разрабатывались с использованием количественных показателей биотических и абиотических факторов с 1955 по 1987 год, для природных очагов чумы – с 1987 по 2018 год.

Для дифференциации числового ряда по квартилям использована функция «Квартильный анализ» электронных таблиц Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Количество и информативность биотических и абиотических факторов, с использованием которых возможно прогнозирование эпизоотической активности очагов чумы, различны для каждой очаговой территории (табл. 2).

Такая специфичность дает возможность дифференцировать очаговые территории.

Для дифференциации предлагается подсчитывать среднюю информативность биотических и абиотических факторов и их показателей, с использованием которых дается прогноз эпизоотической активности очага (колонки 4 и 7 табл. 2) и разность между средней информативностью биотических и абиотических факторов и их показателей (колонка 8 табл. 2).

Затем разность информативности выстраивают в ранжированный ряд, который делится на четыре перцентиля. Для колонки 8 из табл. 2 значения перцентилей следующие:

- 1-й перцентиль – выше 0,56;
- 2-й перцентиль – от 0,40 до 0,56;
- 3-й перцентиль – от 0,14 до 0,39;
- 4-й перцентиль – значения 0,13 и ниже.

Соответственно перцентилям предлагается дифференциация на четыре типа очаговых территорий:

1. Очаги, в которых эпизоотическая активность зависит в значительной степени от биотических факторов (разность информативности входит в первый перцентиль), отнести к типу «Биотический» и обозначать тип латинской буквой *B*.

2. Очаги, в которых эпизоотическая активность зависит в значительной степени от абиотических факторов (разность информативности входит в четвертый перцентиль), отнести к типу «Абиотический» и обозначать тип латинской буквой *A*.

3. Очаги, для которых разность информативности соответствует второму перцентилю, отнести к типу «Биотический/Абиотический» и обозначать тип латинскими буквами *BA*.

4. Очаги, для которых разность информативности соответствует третьему перцентилю, отнести к типу «Абиотический/Биотический» и обозначать тип латинскими буквами *AB*.

Проведенное дифференцирование очаговых территорий показывает, что имеются очаги, в которых биотические факторы – основа для эпизоотической активности очага. К таким очагам относятся в первую очередь Центральнo-Кавказский высокогорный и Прикаспийский песчаный природные очаги чумы.

Представлены очаги, в которых эпизоотическая активность регулируется главным образом абиотическими факторами. Это Восточно-Кавказский высокогорный, Дагестанский равнинно-предгорный природные очаги, Предустюртский автономный очаг и Центральнo-Кызылкумский ЛЭР Кызылкумского автономного очага чумы.

Эпизоотическая активность остальных очаговых территорий регулируется как биотическими, так и абиотическими факторами.

Предлагаемая дифференциация природных очагов чумы имеет выраженное практическое значение. Для очаговых территорий типа *B*, и в некоторые годы *BA*, возможно прогнозировать эпизоотическую активность только на основании данных о численности основных и второстепенных носителей и переносчиков, количестве секторов с эпизоотиями, структуре популяции носителей и переносчиков, т.е. использовать данные, полученные непосредственно при эпизоотологическом обследовании очага чумы. Соответственно, очаговые территории типа *A* могут быть более подвержены влиянию глобальных климатических изменений.

В теоретическом плане предложенная дифференциация укладывается в концепцию Т.Ю. Каримовой [14] о том, что количественные классификации, построенные на основании строгих математических алгоритмов, имеют преимущества перед группировкой объектов по произвольным признакам. Поэтому дифференциация очаговых территорий в соответствии с ролью факторов окружающей среды в эпизоотической активности может применяться по крайней мере как дополнение

Таблица 2 / Table 2

Дифференциация очаговых территорий в соответствии со значимостью факторов окружающей среды для эпизоотической активности

Differentiation of the plague foci according to the significance of the ecology factors for the epizootic activity

Очаг Focus	Сумма информатив- ности биотиче- ских факторов Total informa- tiveness of the biotic factors	Количество биотических факторов The number of the biotic factors	Средняя информатив- ность биотиче- ских факторов The average informativeness of the biotic factors	Сумма информатив- ности абิโอ- тических факторов Total informa- tiveness of the abiotic factors	Количество абิโอ- тических факторов The number of the abiotic factors	Средняя информатив- ность абิโอ- тических факторов The average informativeness of the abiotic factors	Разность между средней информатив- ностью биотических и абิโอ- тических факторов The variation between average informativeness of biotic and abiotic factors	Аббревиатура (в скобках – перцентиль) Abbreviation (the percentile in the brackets)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Модель для прогноза: ожидается или не ожидается эпизоотическая активность очага The predictive model: epizootic activity of the focus is expected or not expected								
Центрально-Кавказский высокогорный Central Caucasian high-mountain	14,82	8	1,85	8,42	10	0,84	1,01	B (1)
Восточно-Кавказский высокогорный East Caucasian high-mountain	0	0	0	19,58	26	0,75	-0,75	A (4)
Дагестанский равнинно-предгорный Dagestan plain-piedmont	2,62	3	0,87	20,34	21	0,97	-0,10	A (4)
Прикаспийский песчаный Pre-Caspian sandy	8,4	5	1,68	11,74	15	0,78	0,90	B (1)
Кызылкумский автономный очаг, ЛЭР Центральные Кызылкумы Kyzylkum autonoimous focus, Central Kyzylkum	7,33	5	1,47	2,67	2	1,34	0,13	A (4)
Модель для прогноза: превысит или не превысит количество зараженных секторов медианное значение весной The predictive model: the number of infestation sectors will exceed or not exceed the median value in spring								
Приаральско-Каракумский автономный очаг Pre-Aral-Karakum autonoimous focus	42,58	30	1,42	19	19,5	0,97	0,44	BA (2)
Прибалхашский автономный очаг, ЛЭР Баканасская равнина Pre-Balkhash autonoimous focus, Baskan plain	23,91	17	1,41	17,15	17	1,01	0,40	BA (2)
Кызылкумский автономный очаг, ЛЭР Северные Кызылкумы Kyzylkum autonoimous focus, North Kyzylkum	32,6	17	1,927	14,82	9	1,65	0,27	AB (3)
Предустуртский автономный очаг Pre-Ustyurt autonoimous focus	20,94	17	1,23	4,49	4	1,12	0,11	A (4)
Североприаральский автономный очаг North-Pre-Aral autonoimous plague focus	13,88	12	1,16	2,23	3	0,74	0,41	BA (2)
Заральский автономный очаг Trans-Aral autonoimous focus	14,31	12	1,19	0,81	1	0,81	0,38	AB (3)

к существующей (Паспортизация природных очагов чумы Российской Федерации. МУ 3.1.3.3395-16. М., 2016). Кроме того, предложенная дифференциация очаговых территорий позволяет искать общие закономерности эпизоотического процесса при чуме в очагах с различными видами носителей, переносчиков, вариантов микроба чумы и географическим расположением.

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

Список литературы

1. Nguyen V.K., Parra-Rojas C., Hernandez-Vargas E.A. The 2017 plague outbreak in Madagascar: Data descriptions and epidemic modelling. *Epidemics*. 2018; 25:20–5. DOI: 10.1016/j.epidem.2018.05.001.
2. Попов Н.В., Карнаухов И.Г., Пакскина Н.Д., Ерошенко Г.А., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Поршаков А.М., Куклев Е.В., Иванова А.В., Корзун В.М., Косилко С.А., Зенкевич Е.С., Попов В.П., Лопатин А.А., Аязбаев Т.З., Балахонov С.В., Кутырев В.В. Оценка современной эпидемиологической обстановки в природных очагах чумы мира. Повышение эффективности эпидемиологического надзора в природных очагах чумы Российской Федерации и прогноз их эпизоотической активности на 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; (1):81–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-81-88.
3. Бурделов Л.А., редактор. Атлас распространения особо опасных инфекций в Республике Казахстан. Алматы; 2012. 232 с.
4. Удовиков А.И., Попов Н.В., Самойлова Л.В., Толоконникова С.И. Климат и трансформация экосистем на примере природных очагов чумы Юго-Востока России. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; (2(112)):21–4.
5. Ралль Ю.М. Природная очаговость и эпизоотология чумы. М.: Медицина; 1965. 363 с.
6. Кучерук В.В. Структура, типология и районирование природных очагов болезней человека. В кн.: П.А. Петрищева, редактор. Итоги развития учения о природной очаговости болезней человека и дальнейшие задачи. М.; 1972. С. 180–212.
7. Слудский А.А. Эпизоотология чумы (обзор исследований и гипотез). Часть 1. Саратов; 2014. 313 с. (Деп. в ВИНТИ 11.08.2014, № 231-В2014). [Электронный ресурс]. URL: http://www.microbe.ru/files/Sludsky_Pt1_2.pdf (дата обращения 05.07.2021).
8. Дятлов А.И., Антоненко А.Д., Грижебовский Г.М., Лабунец Н.Ф. Природная очаговость чумы на Кавказе. Ставрополь; 2001. 345 с.
9. Козлов М.П., Султанов Г.В. Чума. Природная очаговость, эпизоотология. Т. 3. Махачкала; 2000. 303 с.
10. Бурделов Л.А. Дискуссии в эпизоотологии чумы: причины возникновения, методы ведения и основные последствия. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2016; 1:3–24.
11. Дубянский М.А., Кенжебаев А., Степанов В.М., Асенов Г.А., Дубянский Л.Д. Прогнозирование эпизоотической активности чумы в Приаралье и Кызылкумах. Нукус: Каракалпакстан; 1992. 240 с.
12. Дубянский В.М., Герасименко Е.В., Давыдова Н.А., Шкарлет Г.П., Мозлов Г.А., Белогрудов В.А., Власов А.А., Цапко Н.В., Белявцева Л.И., Бамматов Д.М. Прогнозирование эпизоотической активности Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; (3):50–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-50-53.
13. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Ленинград: Медицина, Ленингр. отд-ние; 1978. 296 с.
14. Каримова Т.Ю. Типологическая классификация природных очагов чумы Сахаро-Гобийской пустынной области. *Аридные экосистемы*. 2002; 8(17):13–24.

References

1. Nguyen V.K., Parra-Rojas C., Hernandez-Vargas E.A. The 2017 plague outbreak in Madagascar: Data descriptions and epidemic modelling. *Epidemics*. 2018; 25:20–5. DOI: 10.1016/j.epidem.2018.05.001.
2. Popov N.V., Karnaukhov I.G., Paksina N.D., Eroshenko G.A., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Porshakov A.M., Kouklev E.V., Ivanova A.V., Korzun V.M., Kosilko S.A., Zenkevich E.S., Popov V.P., Lopatin A.A., Ayazbaev T.Z., Balakhonov S.V., Kutyrev V.V. [Analysis of the current epidemiological situation in natural plague foci around the world. Enhancement of the effectiveness of epidemiological surveillance in natural plague foci of the Russian Federation and forecast of their epizootic activity for 2019]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (1):81–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-81-88.
3. Burdelov L.A., editor. [Atlas of the Spread of Particularly Dangerous Infections in the Republic of Kazakhstan]. Almaty; 2012. 232 p.
4. Udobikov A.I., Popov N.V., Samoilova L.V., Tolokonnikova S.I. [Climate and transformation of ecosystems by the example of natural plague foci of South-East of Russia]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2012; (2(112)):21–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-2(112)-21-24.
5. Rall' Yu.M. [Natural Focality and Epizootiology of Plague]. Moscow: "Medicine"; 1965. 363 p.
6. Kucheruk V.V. [Structure, typology and zoning of natural foci of human diseases]. In: Petrishcheva P.A., editor. [The Results of the Development of the Doctrine of the Natural Focality of Human Diseases and Further Tasks]. Moscow; 1972. P. 180–212.
7. Sludsky A.A. [Plague Epizootiology (Review of Research and Hypotheses)]. Part 1. Saratov; 2014. 313 p. (Cited 05 Jul 2021). [Internet]. Available from: http://www.microbe.ru/files/Sludsky_Pt1_2.pdf.
8. Dyatlov A.I., Antonenko A.D., Grizhebovsky G.M., Labunets N.F. [Natural Focality of Plague in the Caucasus]. Stavropol; 2001. 345 p.
9. Kozlov M.P., Sultanov G.V. [Plague. Natural focality, Epizootiology]. Vol. 3. Makhachkala; 2000. 303 p.
10. Burdelov L.A. Discussions around plague epizootiology: causes, methods of management and main consequences. *Karantinye i Zoonoznye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. 2016; 1:3–24.
11. Dubyansky M.A., Kenzhebaev A., Stepanov V.M., Asenov G.A., Dubyanskaya L.D. [Prediction of Plague Epizootic Activity in the Aral Sea Region and Kyzyl Kum]. Nukus: Karakalpakstan; 1992. 240 p.
12. Dubyansky V.M., Gerasimenko E.V., Davydova N.A., Shkarlet G.P., Mozlov G.A., Belogrudov V.A., Vlasov A.A., Tsapko N.V., Belyavtseva L.I., Bammатов D.M. [Forecasting of epizootic activity of the Central Caucasian natural high-mountain plague focus]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (3):50–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-50-53.
13. Gubler E.V. [Computational Methods of Analysis and Recognition of Pathological Processes]. Leningrad: "Medicine", Leningrad office; 1978. 296 p.
14. Karimova T.Yu. [Typological classification of natural plague foci in the Sahara-Gobi desert region]. *Aridnye Ekosistemy [Arid Ecosystems]*. 2002; 8(17):13–24.

Authors:

Dubyansky V.M. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Khalidov A.Kh. Dagestan Plague Control Station. 13, Gagarina St., Makhachkala, 367015, Russian Federation. E-mail: dagchum_tr@mail.ru.

Об авторах:

Дубянский В.М. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Халидов А.Х. Дагестанская противочумная станция. Российская Федерация, 367015, Махачкала, ул. Гагарина, 13. E-mail: dagchum_tr@mail.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-67-78

УДК 616.98:579.852.11(571.63)

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

СИБИРСКАЯ ЯЗВА В ПРИМОРСКОМ КРАЕ (1919–2020 гг.). СООБЩЕНИЕ 2. ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ И РАЙОНИРОВАНИЕ АДМИНИСТРАТИВНЫХ ТЕРРИТОРИЙ

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация; ²Управление Роспотребнадзора по Приморскому краю, Владивосток, Российская Федерация;
³Государственная ветеринарная инспекция Приморского края, Владивосток, Российская Федерация

Цель исследования – анализ эпизоотолого-эпидемиологической ситуации в Приморском крае (1919–2020 гг.) и районирование административных территорий по сибирской язве. **Материалы и методы.** Собраны и проанализированы учетные и отчетные документы, информационные и архивные материалы, использованы статистические справочники и источники литературы. Проведено комплексное эпизоотолого-эпидемиологическое обследование 12 предполагаемых мест сибиреязвенных захоронений и скотомогильников, дана оценка их биологической опасности. **Результаты и обсуждение.** В рамках актуализации Кадастра стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации (2005 г.) уточнено количество заболевших сельскохозяйственных животных и людей: по официальным данным, за период 1930–1979 гг. в 82 стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктах 22 муниципальных образований края учтены заболевания 173 животных и 34 человек с пятью летальными исходами. Совместно с ветеринарной службой края проведена ревизия 12 предполагаемых мест сибиреязвенных захоронений в семи районах края. По итогам комплексного эпизоотолого-эпидемиологического обследования установлена высокая биологическая опасность двух и потенциальная – одного сибиреязвенного захоронения. Культура *Bacillus anthracis*, изолированная на территории Приморского края, относится к одному из канонических SNP-кластеров – A.Br.008/009 глобальной генетической линии A (подгруппа A1). Определены пять критериев оценки эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия по сибирской язве и ранжирование показателей административных территорий края. Проведено районирование административных территорий края по сибирской язве. Рекомендованы профилактические противоэпизоотические и противоэпидемические мероприятия.

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

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

Для цитирования: Дугаржапова З.Ф., Ивачева М.А., Чеснокова М.В., Кравец Е.В., Решетняк Е.А., Уманец А.А., Детковская Т.Н., Кузин Д.Ю., Балахонов С.В. Сибирская язва в Приморском крае (1919–2020 гг.). Сообщение 2. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация и районирование административных территорий. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:67–78. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-67-78

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,
A.A. Umanets³, T.N. Detkovskaya², D.Yu. Kuzin³, S.V. Balakhonov¹

Anthrax in Primorsky Territory (1919–2020). Communication 2. Epizootiological-Epidemiological Situation and Zoning of Administrative Territories

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 epizootiological and epidemiological situation in the Primorsky Territory (1919–2020) and to zone the administrative districts in regard to anthrax. **Materials and methods.** Accounting and reporting documents, information and archival materials were collected and analyzed, statistical reference books and literature sources were used. A comprehensive epizootiological and epidemiological survey of 12 supposed places of anthrax burials and cattle burial grounds was carried out, and their biological hazard assessed. **Results and discussion.** Within the framework of updating the Cadastre of stationary potentially hazardous as regards anthrax areas in the Russian Federation (2005), the number of infected farm animals and human cases was specified: according to official data, over the period of 1930–1979, the disease in 173 animals and 34 people with five deaths was registered in 82 stationary unfavorable for anthrax areas of 22 municipalities of the region. Together with the veterinary service of the region, an audit of 12 supposed places of anthrax burials in seven districts of the region was conducted. Based on the results of a comprehensive epizootiological and epidemiological survey, high biological hazard was established for 2 and potential one – for 1 anthrax burials. The culture of *Bacillus anthracis* isolated on the territory of Primorsky Territory belongs to one of the canonical SNP clusters – A.Br.008/009 of the global genetic line A (subgroup A1). Five criteria for assessing the epizootiological and epidemiological disadvantage for anthrax and the ranking of indicators of the administrative territories in the region have been determined. Zoning of the administrative territories of the region according to risk of anthrax has been carried out. Prophylactic anti-epizootic and anti-epidemic measures have been put forward.

Key words: anthrax, comprehensive epidemiological and epizootologic survey, stationary potentially hazardous as regards anthrax areas, anthrax burial sites, cattle burial grounds.

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., Umanets A.A., Detkovskaya T.N., Kuzin D.Yu., Balakhonov S.V. Anthrax in Primorsky Territory (1919–2020). Communication 2. Epizootiological-Epidemiological Situation and Zoning of Administrative Territories. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:67–78. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-67-78

Received 14.04.2021. *Revised* 11.06.2021. *Accepted* 16.06.2021.

Dugarzhapova Z.F., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5315-479>
Ivacheva M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3794-5337>
Chesnokova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5489-9363>

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

В Российской Федерации учтены более 35,5 тыс. стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП) [1]. Большинство (99,7 %) из них относятся к старым неманифестным, и при этом преобладающая их доля (63,2 %) расположена в Приволжском и Центральном федеральных округах. За 2011–2020 гг. неблагополучие по сибирской язве отмечалось в пяти федеральных округах (Приволжском, Центральном, Южном, Северо-Кавказском и Сибирском), а с 2016 г. – также и в Уральском. В 2017 г. сибирская язва среди сельскохозяйственных животных (СХЖ) и людей в РФ не отмечалась. В 2018 г. зарегистрированы заболевания четырех голов крупного рогатого скота (КРС) и три случая кожной формы сибирской язвы у людей в республиках Дагестан (одна голова КРС и один человек) и Тыва (три головы КРС и два человека). В 2019 г. в Республике Дагестан после вынужденного убоя коровы заболели четыре человека, в 2020 г. – пять случаев среди людей и один – КРС [2].

На фоне ежегодной регистрации sporadических и групповых случаев сибирской язвы в нашей стране в 2016 г. произошла крупнейшая эпизоотия этой особо опасной болезни на Ямале. Активизации сибиреязвенных почвенных очагов, известных с конца XIX – начала XX в., способствовали аномальные климатические условия. Отсутствие плановой специфической иммунизации животных в течение последнего десятилетия и свободный выпас оленей на неблагополучных по сибирской язве территориях, а также трансмиссивный путь передачи возбудителя стали причинами чрезвычайной ситуации в арктической части Западной Сибири, когда заболели 2649 оленей и 36 человек с одним летальным исходом [3, 4]. По опыту работ ликвидации сибирской язвы на Ямале внесены изменения и дополнения по моровым полям, организации лабораторной диагностики и подтверждению клинического диагноза дополнительно молекулярно-генетическим методом в СП 3.1.7.2629-10 «Профилактика сибирской язвы», а затем пересмотрены МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» и СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Эпизоотологическая и эпидемиологическая ситуация по сибирской язве в РФ признана неустойчивой ввиду наличия не учтенных практически на всей территории страны моровых полей, бесхозных сибиреязвенных захоронений и скотомогильников (СЯЗ и ССМ), находящихся в неудовлетворительном ветеринарно-санитарном состоянии; неполного учета

СХЖ и их охвата специфической вакцинацией в ряде регионов страны; недостаточной иммунной прослойки населения групп профессионального риска.

В 24 субъектах азиатской части Российской Федерации, согласно Кадастру СНП РФ (2005 г.) и Перечню скотомогильников (2012 г.), учтены 7193 СНП и 557 сибиреязвенных скотомогильников [1, 5, 6]. За период 1985–2020 гг. зарегистрированы 3306 случаев заболевания сельскохозяйственных животных в 134 СНП 13 субъектов и 122 человек в 36 СНП 9 субъектов. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по сибирской язве в Сибири и на Дальнем Востоке на современном этапе характеризуется неравномерностью территориального распределения с выраженным неблагополучием в южных субъектах Сибири (Алтайский край, Омская область, республики Бурятия и Тыва) и районах Крайнего Севера (Ямало-Ненецкий автономный округ, Республика Саха – Якутия). Одним из аспектов повышения эффективности эпидемиологического надзора за сибирской язвой является оптимизация эпидемиологического мониторинга. Районирование территории Северного Кавказа с использованием интегрированного показателя риска инфицирования и индекса эпизоотичности позволило выделить четыре группы эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия по сибирской язве [7]. Таким образом, анализ факторов риска и ранжирование территории РФ по степени эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия и риска осложнения эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по сибирской язве позволят усовершенствовать систему профилактических мероприятий, направленных на снижение потенциального риска заражения сибирской язвой животных и людей [8].

Цель работы – анализ эпизоотолого-эпидемиологической ситуации в Приморском крае (1919–2020 гг.) и районирование административных территорий по сибирской язве.

Материалы и методы

Проведены сбор и анализ учетных и отчетных документов, информационных материалов и сведений по заболеваниям животных и людей сибирской язвой Государственной ветеринарной инспекции Приморского края, КГБУ «Краевая ветеринарная противоэпизоотическая служба» Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю, ФКУЗ «Приморская противочумная станция» и муниципальных образований районов Приморского края.

В работе использованы справочники и источники литературы, журналы эпизоотического состояния районных ветеринарных станций по борьбе с болезнями животных, журналы регистрации неблагополучных по сибирской язве пунктов, архивные материалы вышеуказанных учреждений.

Проведено комплексное эпизоотолого-эпидемиологическое обследование 12 предполагаемых мест сибиреязвенных захоронений с известным местоположением в 11 СНП семи районов края (Анучинский, Спасский, Октябрьский, Пожарский, Ханкайский, Черниговский и Яковлевский) с ретроспективным и оперативным эпизоотолого-эпидемиологическим анализом ситуации по сибирской язве на административной территории, изучением санитарно-ветеринарного состояния объектов с известным местоположением в соответствии с требованиями действующих санитарно-эпидемиологических и ветеринарных правил в совокупности с результатами лабораторных исследований проб объектов окружающей среды СЯЗ на сибирскую язву. При отборе проб СЯЗ (без признаков консервации) использованы гидравлические навесные ямобуры различного диаметра бурильно-крановых машин и универсальных буровых машин на автомобильных шасси, отработаны методики отбора, транспортировки и подготовки проб костей и костных фрагментов животных из СЯЗ/ССМ [9]. По итогам работы дана оценка биологической опасности СЯЗ/ССМ.

Для ранжирования и оценки эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия по сибирской язве административных территорий Приморского края проведен анализ по пяти критериям: показателю плотности СНП, индексу эпизоотичности по Таршису, количеству заболеваний людей, животных, количеству ССМ/СЯЗ, а также использована статистическая функция ранжирования в программе Excel.

Результаты и обсуждение

Эпизоотологическая ситуация по сибирской язве. По официальным данным Государственной ветеринарной инспекции Приморского края и эпизоотическим журналам станций по борьбе с болезнями животных КГБУ «Приморская ветеринарная служба», сведения о заболеваниях животных имеются за период 1930–2000 гг. Установлено, что в 82 СНП 22 муниципальных образований Приморского края зарегистрированы заболевания 173 СХЖ, из них 115 голов КРС (64,7 %), 49 лошадей (28,3 %), 8 свиней (4,6 %) и 1 животное (0,6 %), вид которого не указан в эпизоотическом журнале Спасского района (1934 г.). В видовой структуре преобладание заболевшего КРС объясняется его большим поголовьем среди СХЖ края, заболевания мелкого рогатого скота не отмечались.

Всего за 102-летний период наблюдения (1919–2020 гг.) сибирская язва зарегистрирована в течение

39 календарных лет, из них сведения о количестве заболевших и павших животных документированы за 34 года. Сведения и материалы о болезни среди животных за 13 календарных лет (1919–1929, 1941 и 1943 гг.) не найдены, а также не сохранились данные по отдельным годам в некоторых пунктах. В 30-е гг. XX в. заболевания животных отмечались гораздо чаще, чем в 40-е гг., затем некоторый прирост количества заболевших и павших СХЖ произошел в 1950-е гг. В 1960-е и 1990-е гг. сибирская язва отмечалась в виде спорадических случаев, в 1977 и 1979 гг. зарегистрированы вспышки болезни (рис. 1).

В 1934 г. в 24 пунктах пяти районов края (Октябрьский, Спасский, Ханкайский, Хорольский, Черниговский) заболели 39 СХЖ, из них 26 голов КРС, 12 лошадей и 1 животное, вид которого не указан в эпизоотическом журнале Спасского района. В 1936 г. – в 17 пунктах семи районов (Дальнереченский, Октябрьский, Спасский, Черниговский, Уссурийский, Ханкайский и Хорольский), из них в первых четырех районах сохранились сведения о заболевании 11 СХЖ (девять коров и две лошади).

Следующим этапом наших исследований стало сопоставление индексов эпизоотичности по М.Г. Таршису с соавт. (1972) [10], учитывающих степень активности СНП и количество всех населенных пунктов на исследуемой территории, с общепринятым индексом эпизоотичности, который рассчитывается по отношению числа лет регистрации эпизоотии к числу лет наблюдений. При сравнении данных показателей установлено, что наиболее информативен индекс эпизоотичности по Таршису (ИЭТ) как показатель напряженности эпизоотической и эпидемической ситуации, который можно использовать для оценки эпизоотологического неблагополучия и зонирования административных территорий по степени потенциального риска заражения возбудителем сибирской язви.

Используя показатели ИЭТ, рассчитанные для административных территорий Приморского края в сравнении со средним краевым показателем (0,006), мы выделили три зоны, отличающиеся между собой по степени потенциального риска заражения возбудителем сибирской язви:

1. Зона потенциально высокого риска заражения возбудителем сибирской язви (ИЭТ превышают краевой показатель в 1,3–5,6 раза) включает десять южных и юго-западных муниципальных образований (районов) края: Уссурийский городской округ (ГО), Спасский муниципальный район (МР) (включая Спасский ГО), Черниговский МР, Хорольский муниципальный округ (МО), Дальнереченский МР (включая Дальнереченский ГО), Михайловский МР, Анучинский и Ханкайский МО (рис. 2).

2. В зоне среднего или умеренного риска заражения возбудителем сибирской язви находятся 17 муниципальных образований (районов): Октябрьский МО, краевой центр Владивостокский ГО, Пожарский МР, Шкотовский МР (включая ГО Большой Камень

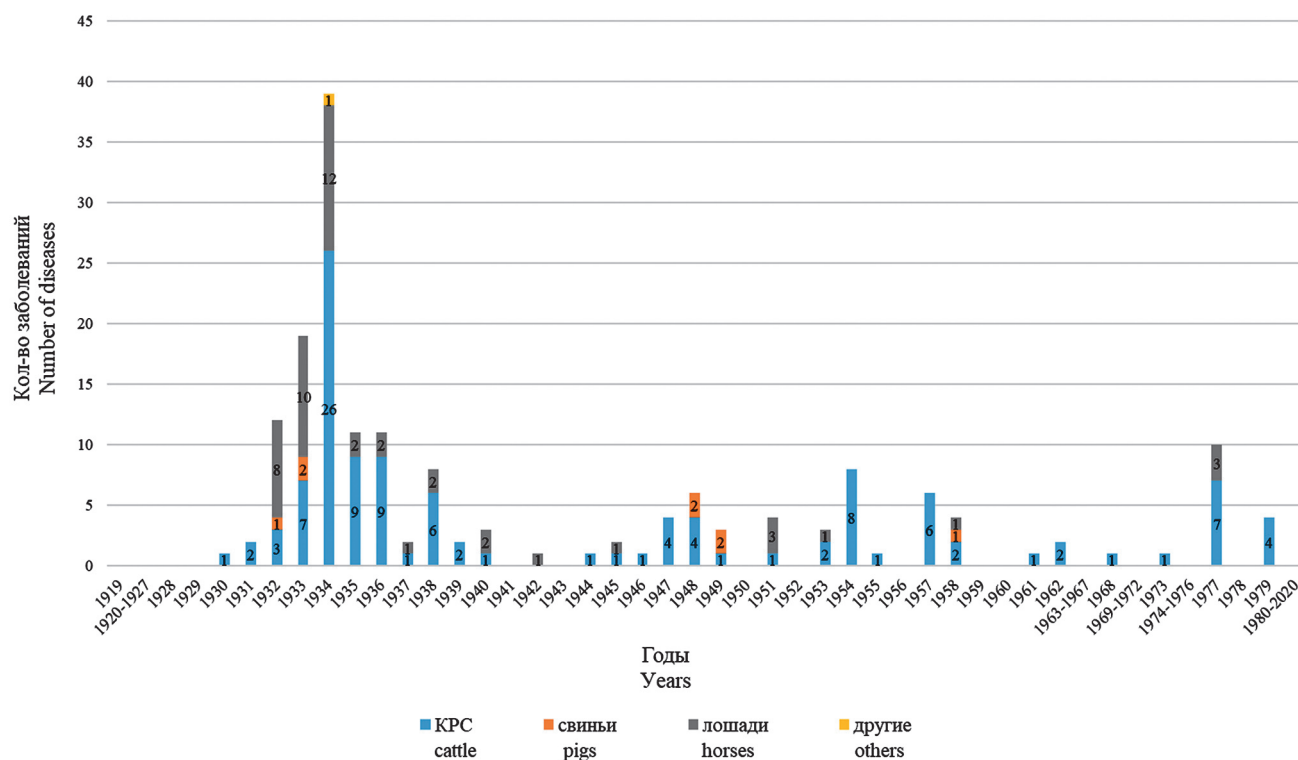


Рис. 1. Заболевания животных сибирской язвой в Приморском крае в 1919–2020 гг.

Fig. 1. Number of anthrax cases among animals in the Primorsky Territory in 1919–2020

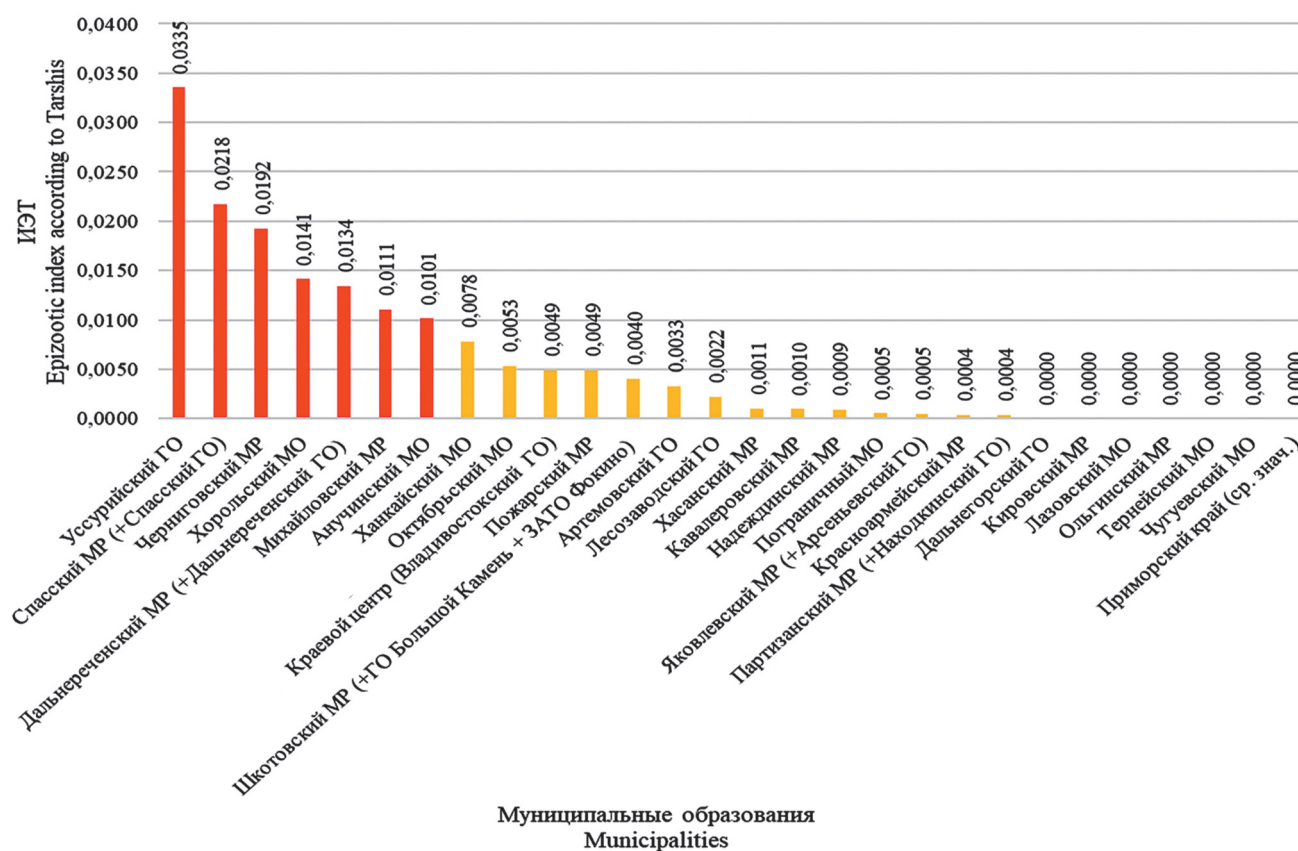


Рис. 2. Распределение индекса эпизоотичности по Таршису для муниципальных образований (районов) Приморского края за период 1919–2020 гг.

Fig. 2. Distribution of the Tarshis epizootic index for municipalities (districts) of Primorsky Territory for the period of 1919–2020

и ГО Фокино), Артемовский ГО, Лесозаводский ГО, Хасанский МР, Кавалеровский МР, Надеждинский МР, Пограничный МО, Яковлевский МР (+Арсеньевский ГО), Красноармейский МР и Партизанский МР (+Находкинский ГО).

3. Зона условно благополучная (за весь исследуемый период сибирская язва среди СХЖ и людей не зарегистрирована) включает шесть муниципальных образований (районов) края: Дальнегорский ГО, Кировский МР, Лазовский МО, Ольгинский МР, Тернейский МО, Чугуевский МО.

Эпидемиологическая ситуация по сибирской язве. В 1941–1952 гг. от легочной и генерализованной форм сибирской язвы умерли шесть человек [11]. По данным журналов регистрации неблагополучных по сибирской язве пунктов Управления Роспотребнадзора в Приморском крае, в шести СНП пяти районов края в 1953–1979 гг. сибирской язвой заболели 30 человек, из них один случай с летальным исходом.

Документальные и архивные данные по сибирской язве изучены М.А. Ян (1983 г.), в Приморском крае за период 1941–1952 гг. известны заболевания шести человек. При анализе ситуации по сибирской язве в крае (1904–1980 гг.) Л.Е. Горковенко с соавт. [11] установлено, что во время вспышек в 1977 и 1979 гг. заболели в двух районах края 27 человек, из них умерли трое.

По нашим уточненным данным, за период 1931–1979 гг. в девяти пунктах девяти районов края сибирской язвой заболели 34 человека, из них умерли пятеро. В 1931 г. в с. Ляличи Михайловского района заболел и умер один человек, сведения об источнике инфекции (больном животном) не найдены. В 1948 г. в с. Чернышевка Анучинского района заболел один человек. В 1953 г. в с. Горный Хутор Черниговского района заболели два человека, заразившиеся после вынужденного убоя двух голов КРС (табл. 1).

В 1977 г. сибирская язва зарегистрирована в Анучинском и Яковлевском районах края, в двух пунктах, где ранее сибирская язва не встречалась. По данным журнала регистрации неблагополучного по сибирской язве пункта и эпизоотического журнала Анучинской станции по борьбе с болезнями животных, 30 июля 1977 г. в с. Пухово Анучинского района заболела и пала одна лошадь. Диагноз сибирской язвы установлен серологически на основании положительной реакции преципитации. При снятии кожи с павшего животного заболела одна женщина пенсионного возраста. Труп животного утилизирован сжиганием.

В Яковлевском районе в конце июля – начале августа 1977 г. на территории летнего лагеря молочно-товарной фермы колхоза «Красный партизан» и на пастбище в районе озера Подкова пали семь коров и одна лошадь, в районе утилизации навоза по ул. Колхозной с. Новосысоевка пала одна лошадь, о чем сделаны записи в эпизоотическом журнале Яковлевского района и архивных материалах

Новосысоевского сельского поселения. Павшие животные утилизированы сжиганием. В журнале регистрации неблагополучного по сибирской язве пункта Яковлевского района указано, что с 1 июля по 5 августа 1977 г. после контакта с мясом и мясopодуктами заболели сибирской язвой 15 человек. Среди заболевших – четыре ветеринарных фельдшера, два работника кафе и один скотник. Диагноз сибирской язвы у одного из больных подтвержден бактериологическим методом. С 4 по 28 августа, в период карантина, в населенных пунктах Новосысоевка и Лукино привито 3345 голов скота, обследованы и получили лечение 1077 животных. По мнению исследователей, причиной возникновения эпизоотии стало проведение гидромелиоративных работ на неблагополучном в прошлом пастбище [11]. В 2013 г. при обследовании двух предполагаемых почвенных очагов признаки захоронения животных не обнаружены: первое местоположение – на территории бывшего летнего лагеря МТФ по опознавательным знакам трех ильмов, расположенных по левую сторону от дороги около речки напротив фермы, и второе – среди деревьев в редколесье.

В Октябрьском районе летом 1979 г., согласно эпизоотическому журналу Покровской ветстанции, в с. Покровка заболели три коровы, пали две и вынужденно убита одна. После контакта с зараженным мясом и мясopодуктами КРС в течение одной недели (с 9 по 16 июля) заболели девять человек, один из которых умер, о чем сделаны записи в журнале регистрации неблагополучного по сибирской язве пункта. Эпизоотический очаг находился на территории летнего лагеря МТФ № 1 в совхозе «Искра». Диагноз сибирской язвы у животных лабораторно подтвержден бактериологическим и серологическим методами. Захоронение останков животных, павших от сибирской язвы, произведено на территории скотомогильника. Затем в этом же году сибирской язвой заболела одна корова в с. Устиновка Кавалеровского района, после вынужденного убоя госпитализированы три человека, один из которых умер. Диагноз сибирской язвы подтвержден выделением культуры *Bacillus anthracis*.

Оценка биологической опасности СЯЗ.

Согласно Перечню скотомогильников (2012 г.) учтены 12 СЯЗ с известным местоположением в семи районах края (Анучинском, Спасском, Октябрьском, Пожарском, Ханкайском, Черниговском и Яковлевском) [10]. Судебной коллегией по гражданским делам Приморского краевого суда от 10 июля 2012 г. определено, что ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» в 2013 г. проведено комплексное эпизоотологическое и эпидемиологическое обследование и дана экспертная оценка биологической опасности по сибирской язве 12 предполагаемых мест сибиреязвенных захоронений на территории 11 неблагополучных пунктов, предложен комплекс противосибиреязвенных мер по трем направлениям: консервация СЯЗ, пред-

Таблица 1 / Table 1

Заболевания людей сибирской язвой в Приморском крае (1931–1979 гг.)

Humans cases of anthrax in the Primorsky Territory (1931–1979)

Годы проявлений Years of manifestation	Место регистрации Site of registration		Зарегистрированы случаи (человек) Cases recorded (human)		Источник инфекции Source of infection
	район district	СНП potentially hazardous as regards anthrax areas	заболели got sick	умерли died	
М.А. Ян и др. (1983 г.) M.A. Yan <i>et al.</i> (1983)					
1941–1952	По Приморскому краю Across Primorsky Territory		6	–	–
Горковенко Л.Е. и др. (2003 г.) [11] Gorkovenko L.E. <i>et al.</i> (2003) [11]					
1977	–	Три населенных пункта Three settlements	15	1	–
1979	–		12	2	–
Итого Total	–		27	3	–
Управление Роспотребнадзора по ПК (2018 г.) Rosptotrebnadzor Administration in the Primorsky Territory (2018)					
1953	Черниговский Chernigovsky	Горный Хутор Gorny Khutor	2	0	–
1976	Анучинский Anuchinsky	Чернышевка Chernyshevka	1	0	–
1977		Пухово Pukhovo	1	0	–
1977	Яковлевский Yakovlevsky	Яковлевка Yakovlevka	15	0	–
1979	Октябрьский Oktyabr'sky	Покровка Pokrovka	8	0	–
1979	Кавалеровский Kavalerovsky	Устиновка Ustinovka	3	1	–
Итого Total	5	6	30	1	–
Иркутский НИПЧИ (2020 г.) Irkutsk RAPI (2020)					
1931	Михайловский Mikhailovsky	Ляличи Lyalichi	1	1	1 КРС 1 cattle
1948	Анучинский Anuchinsky	Чернышевка Chernyshevka	1	–	н. д. n. d.
	Лесозаводский Lesozavodsky	Лесозаводск Lesozavodsk	1	1	1 КРС 1 cattle
1953	Чернышевский Chernigovskiy	Горный Хутор Gornyy Khutor	2	–	2 КРС 2 cattle
1957	Иманский (ныне Дальнереченский) Imansky (now DalneRechensky)	Рождественка Rozhdestvenka	1	1	н. д. n. d.
1977, июль–август 1977, July–August	Яковлевский Yakovlevsky	Новосысоевка Novosysoevka	15	–	7 КРС и 2 лошади 7 cattle and 2 horses
1977, июль 1977, July	Анучинский Anuchinsky	Пухово Pukhovo	1	–	1 лошадь 1 horse
1979, июль 1979, July	Октябрьский Oktyabr'sky	Покровка Pokrovka	9	1	н. д. n. d.
1979	Кавалеровский Kavalerovsky	Устиновка Ustinovka	3	1	1 КРС 1 cattle
Итого Total	9	9	34	5	15

Примечание: н. д. – нет данных.

Note: n. d. – no data.

ставляющих высокую биологическую опасность по сибирской язве; санитарно-защитное зонирование СЯЗ; мероприятия, обеспечивающие санитарно-эпидемиологическое благополучие населения.

Условно опасным признано предполагаемое место сибиреязвенного захоронения в местности Алтыновская Сопка (1938 г.), на месте захоронения обнаружены костные фрагменты СХЖ, состояние объекта не соответствовало требованиям санитарно-ветеринарных правил. Наибольшую биологическую опасность представляли два сибиреязвенные захоронения: в с. Астраханка Ханкайского района (1933, 1934 гг.) и с. Покровка Октябрьского района (1979 г.). В пробе почвы СЯЗ с. Астраханка обнаружена ДНК и выделена культура *B. anthracis* с атипичными свойствами. В настоящее время село вошло в состав с. Камень-Рыболов). В с. Покровка объект находится на возвышенности и совмещен с местом захоронения скота бывшего колхоза «Искра».

В местности Алтыновская Сопка предполагаемое СЯЗ представляет собой несанкционированную свалку биологических отходов. Администрации Черниговского муниципального района предложено провести санитарную очистку территории местности с утилизацией биологических отходов сжиганием, в дальнейшем – запретить использовать данную территорию как несанкционированный полигон сброса биологических отходов.

Для обеспечения биологической безопасности СЯЗ в СНП Астраханка, расположенного на территории учебного заведения в жилой зоне с. Камень-Рыболов, администрации Ханкайского муниципального района рекомендовано провести консервацию объекта в соответствии с п. 6.9 ВП 13-7-2/469 «Ветеринарно-санитарные правила сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов» (1995 г.), с предварительной обработкой почвы дезинфицирующими средствами спороцидного действия согласно п. 5.19 ВП 13.3.1320-96 «Профилактика инфекционных болезней. Профилактика и борьба с болезнями, общими для человека и животных. 6. Сибирская язва»; выкапыванием вокруг скотомогильника траншеи глубиной не менее 2 м; бетонированием траншеи и территории захоронения слоем бетона не менее 0,4 м. Для СЯЗ в с. Покровка Октябрьского района рекомендовано произвести ограждение скотомогильника с опознавательными знаками, не допускать выпаса скота, покоса травы, выноса земли за пределы скотомогильника и нахождения там людей, контролировать состояние скотомогильника в соответствии с п. 4.1 ВП 13.3.1320-96 и п. 7.1 СП 3.1.7.2629-10 «Профилактика сибирской язви».

Ввиду отсутствия свидетелей событий, достоверных данных в эпизоотических журналах учреждений ветеринарии, журналах регистрации неблагополучного по сибирской язве пункта учреждений Роспотребнадзора, архивных отделов муниципальных районов Приморского края, точные местоположения девяти сибиреязвенных захо-

ронений в восьми СНП: в с. Пухово Анучинского, с. Новосысоевка Яковлевского, с. Благовещенка и Федоровка Пожарского, с. Шашевка Спасского, местности Халкидон Черниговского, с. Платоно-Александровская и Троицкое Ханкайского районов Приморского края – не установлены. При осмотре местности и отборе проб почвы изменения поверхности рельефа и характерные следы захоронений (смешивание и смещение почвенных слоев, наличие остатков кострового пожара, останки животных и их костные фрагменты) не обнаружены, результаты исследований проб объектов окружающей среды на сибирскую язву отрицательные. Соответственно, вышеуказанные восемь мест предполагаемых сибиреязвенных захоронений оценены как безопасные по сибирской язве. В 2020 г. Государственной ветеринарной инспекцией Приморского края предоставлены данные о невозможности постановки на кадастровый учет 8 из 12 СЯЗ ввиду вступления в законную силу решения Фрунзенского суда г. Владивостока от 28.05.2020 по делу № 2-1329/19 об установлении факта отсутствия захоронения трупов павших от сибирской язви сельскохозяйственных животных в восьми поселенческих и межпоселенческих территориях по заявлению Администрации Приморского края.

При отсутствии точного местоположения девяти предполагаемых мест сибиреязвенных захоронений в восьми СНП применение нормативов санитарно-защитного зонирования согласно п. 4.2 СанПиН 2.2.1/2.1.1.1200-03 «Санитарно-защитные зоны и санитарная классификация предприятий, сооружений и иных объектов» в новой редакции от 01.03.2008 не представляется возможным. Сибиреязвенные захоронения в с. Камень-Рыболов (Астраханка) и с. Покровка как скотомогильники с захоронениями в ямах являются объектами I класса опасности и требуют санитарно-защитного зонирования радиусом в 1000 м, согласно п. 4.2 СанПиН 2.2.1/2.1.1.1200-03. Места предполагаемых сибиреязвенных захоронений сохраняют статус «стационарно неблагополучный по сибирской язве пункт» без срока давности. После консервации СЯЗ в с. Астраханка ввиду расположения объекта в жилой зоне с. Камень-Рыболов ответственному юридическому лицу рекомендовано ходатайствовать об уменьшении размера санитарно-защитной зоны (СЗЗ) данного объекта до пределов его ограждения, согласно п. 7.4 СП 3.1.7.2629-10 «Профилактика сибирской язви» и п. 4.2 СанПиН 2.2.1/2.1.1.1200-03. Для разработки проекта СЗЗ рекомендуем применить разработанные методические рекомендации МР 3.1.0232-21 «Определение эпидемиологической опасности почвенных очагов сибирской язви» (введены в действие с 01.03.2021).

Для обеспечения безопасности лиц, привлекаемых к земляным работам при консервации известных сибиреязвенных объектов, необходимо вакцинировать рабочих против сибирской язви и во время проведения работ обеспечить их защитными костю-

мами, предусмотреть медицинское наблюдение и проведение экстренной антибиотикопрофилактики, а также соблюдение режима безопасности работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности) и профилактики сибирской язвы в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». В целях выполнения требований действующих санитарных и ветеринарных правил ВП 13.3.1320-96 и СП 3.1.7.2629-10 рекомендовано постоянно поддерживать высокий уровень охвата ежегодной вакцинацией против сибирской язвы сельскохозяйственных животных в Приморском крае; подготовки медицинских и ветеринарных специалистов по этиологии, клинике и профилактике сибирской язвы; информирования населения о мерах профилактики сибирской язвы.

Описание культур сибирезавенного микроба.

В коллекции музея живых культур института хранятся три штамма возбудителя сибирской язвы, изолированные на территории Приморского края. Штамм *B. anthracis* И-274 выделен бактериологическим методом в 1977 г. врачом Приморской ПЧС М.Д. Кызыловой из материала карбункула больного человека с. Новосысоевка Яковлевского района. Этим же врачом в 1979 г. из материала печени трупа больного человека с. Устиновка Кавалеровского района изолирован штамм *B. anthracis* И-275. Оба штамма отнесены к атипичным по основному индикационному тесту лабораторной диагностики – отсутствие обеих плазмид вирулентности (pXO1/pXO2). VNTR- и SNP-анализ штамма *B. anthracis* И-275 показал, что он относится к одному из канонических SNP-кластеров – A.Br.008/009, в который входят также штаммы, изолированные в Республике Бурятия, Красноярском крае, Тюменской области, в рамках глобальной генетической линии A (подгруппа A1).

В 2013 г. при исследовании пробы почвы сибирезавенного захоронения СНП с. Камень-Рыболов (Астраханка) Ханкайского района сотрудниками Иркутского противочумного института биопробным методом выделена культура сибирезавенного микроба – штамм *B. anthracis* И-375 с атипичными свойствами. Атипичность свойств культуры проявлялась в неоднозначности результатов тестов на пенициллинзависимую и гемолитическую активность, способности к капсулообразованию *in vitro* и *in vivo*. При контроле фаголизависимости с двумя специфическими сибирезавенными фагами культура лизировалась только одним из них. Методом ПЦР обнаружены ген плазмиды токсинообразования (pXO1) и нестабильность детекции гена плазмиды капсулообразования (pXO2). В биологической пробе на беспородных белых мышах и морских свинках культура авирулентна.

На основе систематизации и анализа сведений о происхождении, биологических, молекулярно-генетических свойствах штаммов в институте создана и зарегистрирована (свидетельство о государственной регистрации № 2016620321 в Реестре баз

данных от 10.03.2016) пополняемая база данных «Биологические свойства штаммов *Bacillus anthracis*, изолированных на территории Сибири и Дальнего Востока», в которую вошла информация и о штаммах Приморского края.

Ранжирование и районирование административных территорий по сибирской язве.

На основании комплексного эпизоотолого-эпидемиологического анализа ситуации по сибирской язве за 102-летний период (1919–2020 гг.) проведено ранжирование по каждому из пяти критериев, затем количественная оценка рангов по следующей формуле:

$$\sum R = R_1 + R_2 + R_3 + R_4 + R_5,$$

где $\sum R$ – сумма рангов для отдельных административных территорий, субъектов; R_1 – ранг по плотности СНП на 1 тыс. кв. км; R_2 – ранг по количеству заболевших СХЖ; R_3 – ранг по количеству заболевших людей; R_4 – ранг индекса эпизоотичности по Таршису; R_5 – ранг количества СЯЗ/ССМ.

Для объективного обоснования оценки эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия по сибирской язве сравниваем суммы рангов, полученных для отдельных административных территорий, по пяти критериям со средним показателем суммы рангов для Приморского края:

$$R_{\text{ср}} = (R_1 + R_2 + R_3 + R_4 + R_5) / 5.$$

Среднекраевой показатель суммы рангов составил 51,1. Далее определяем группы административных территорий, достоверно превышающие средний показатель, находящиеся на уровне и ниже уровня среднего показателя. Расчеты, представленные в табл. 2, позволили нам выделить три группы территорий.

Методом ранжирования проведено районирование административных территорий Приморского края по степени эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия по сибирской язве.

Первая группа (I) – административные территории с выраженным эпизоотолого-эпидемиологическим неблагополучием по сибирской язве (сумма рангов – от 71 до 126), к ним относятся: Октябрьский МО, Черниговский МР, Ханкайский МО, Михайловский МР, Дальнереченский МР (включая Дальнереченское ГО), Спасский МР (+Спасский ГО), Хорольский МО, Анучинский МО, Уссурийский ГО и Яковлевский МР (+Арсеньевский ГО).

В Черниговском районе (сумма рангов – 126) учтены семь пунктов, где отмечалась эпизоотическая активность с 1931 по 1953 год. Сибирская язва зарегистрирована у десяти коров и четырех лошадей, известны два случая заболевания людей. Черниговский район имеет высокий показатель плотности СНП (3,8) и отнесен к зоне потенциально высокого риска заражения возбудителем сибирской язвы (ИЭТ=0,019). В районе учтено одно сибирезавенное захоронение.

Таблица 2 / Table 2

Ранжирование административных территорий Приморского края по степени эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия по сибирской язве

Ranking of the administrative districts in the Primorsky Territory according to the degree of epizootiological and epidemiological hazard as regards anthrax

№	Район District	Плотность СНП Density of anthrax disad- vantaged areas	R1	ИЭТ Epizootic index by Tarshis	R2	Заболевания СХЖ Diseases in farm animals	R3	Заболевания людей Human cases	R4	Кол-во СЯЗ Number of anthrax burials	R5	Сумма рангов Sum of ranks	Группы территорий Groups of territories
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	Черниговский МР Chernigovskiy MD	3,80	26	0,019	25	14	25	2	23	1	27	126	I
2	Октябрьский МО Oktyabr'sky MD	1,76	21	0,005	19	5	17	9	26	1	27	110	
3	Ханкайский МО Khankaisky MD	1,49	20	0,008	20	25	26	0	1	1	27	94	
4	Михайловский МР Mikhaylovsky MD	1,82	23	0,011	22	9	21	1	20	0	1	87	
5	Дальнереченский МР (+Дальнереченский ГО) Dal'nerechensky MD (+Dal'nerechenskiy UD)	0,81	17	0,013	23	7	19	1	20	0	1	80	
6	Спасский МР (+Спасский ГО) Spassky MD (+Spassky UD)	2,93	25	0,022	26	51	27	0	1	0	1	80	
7	Хорольский МО Khorolsky MD	4,57	27	0,014	24	10	24	0	1	0	1	77	
8	Анучинский МО Anuchinsky MD	1,30	19	0,010	21	2	10	2	23	0	1	74	
9	Уссурийский ГО Ussuriysky UD	2,76	24	0,034	27	6	18	0	1	0	1	71	
10	Яковлевский МР (+Арсеньевский ГО) Yakovlevsky MD (+Arsenyevsky UD)	0,42	13	0,001	9	9	21	15	27	0	1	71	
11	Лесозаводский ГО Lesozavodsky UD	0,33	12	0,002	14	7	19	1	20	0	1	66	II
12	Артемовский ГО Artemovskiy UD	0,50	15	0,003	15	9	21	0	1	0	1	53	
13	Кавалеровский МР Kavalerovsky MD	0,24	8	0,001	12	1	7	3	25	0	1	53	
14	Краевой центр Владивосток. ГО Regional center Vladivostok. UD	1,78	22	0,005	17	2	10	0	1	0	1	51	
15	Шкотовский МР (+ГО Большой Камень +ЗАТО Фокино) Shkotovsky MD (+Bol'shoy Kamen' UD +Fokino)	1,13	18	0,004	16	3	13	0	1	0	1	49	
16	Надеждинский МР Nadezhdinsky MD	0,63	16	0,001	11	3	13	0	1	0	1	42	
17	Хасанский МР Khasansky MD	0,48	14	0,001	13	3	13	0	1	0	1	42	
18	Пожарский МР Pozharsky MD	0,27	10	0,005	17	2	10	0	1	0	1	39	
19	Партизанский МР (+Находкинский ГО) Partizanskiy MD (+Nakhodkinsky UD)	0,24	9	0,000	7	3	13	0	1	0	1	31	
20	Пограничный МО Pogranichnyy MD	0,27	11	0,001	10	1	7	0	1	0	1	30	
21	Красноармейский МР Krasnoarmeysky MD	0,05	7	0,000	7	1	7	0	1	0	1	23	

Окончание табл. 2 / Ending of the Table 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
22	Дальнегорский ГО Dal'negorsky UD	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	5	III
23	Кировский МР Kirovsky MD	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	5	
24	Лазовский МО Lazovsky MD	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	5	
25	Ольгинский МР Olgin'sky MD	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	5	
26	Тернейский МО Terneisky MD	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	5	
27	Чугуевский МО Chuguyevsky MD	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	5	
	M±m											51,1	
	Всего Total	0,51				172		34		3			

В Октябрьском районе (сумма рангов – 110), согласно Кадастру, учтены три СНП, в которых отмечались единичные заболевания КРС в 1932–1936 гг. и вспышка в 1979 г. (три головы КРС и девять человек). Район относится к первой группе с высокой плотностью СНП (1,76) и входит в зону среднего или умеренного риска заражения возбудителем сибирской язвы (ИЭТ=0,0053). Сибиреязвенное захоронение площадью 900 кв. м расположено в с. Покровка.

Ханкайский и Михайловский районы имеют высокую плотность СНП (1,49 и 1,82) и входят в зону с высоким риском заражения возбудителем сибирской язвы (0,008 и 0,011). В пяти СНП Ханкайского района зарегистрированы заболевания 25 СХЖ (11 голов КРС, 11 лошадей и 3 свиньи) в период 1931–1938 гг. В Михайловском районе в период 1930–1951 гг. зарегистрированы заболевания девяти голов СХЖ, в 1931 г. заболел один человек. Спасский район отличается высокой эпизоотической активностью (51 СХЖ) за семь календарных лет в период 1933–1948 гг. По плотности СНП район находится в первой группе с большим показателем (2,93), где высок риск заражения возбудителем сибирской язвы (ИЭТ=0,022).

Вторая группа (II) – административные территории средней степени эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия по сибирской язве с суммой рангов от 66 до 23: Лесозаводский ГО, Артемовский ГО, Кавалеровский МР, краевой центр Владивостокский ГО, Шкотовский МР (включая ГО Большой Камень и ЗАТО Фокино), Надеждинский МР, Хасанский МР, Пожарский МР и три района с единичными случаями сибирской язвы (Партизанский МР (включая Находкинский ГО), Пограничный МО, Красноармейский МР).

Третья группа (III) – относительно благополучные по сибирской язве административные территории – сумма рангов равна 5. В нее входят шесть районов, где заболевание не регистрировалось (Дальнегорский ГО, Кировский МР, Лазовский МО, Ольгинский МР, Тернейский МО, Чугуевский МО).

Для всех трех групп административных территорий необходимо проведение следующего комплекса организационных профилактических противоэпизоотических и противоэпидемических мероприятий:

1) комплексность управленческих решений и межведомственного взаимодействия, постоянный оперативный обмен информацией между медицинской, ветеринарной и другими заинтересованными службами;

2) проведение должного учета, контроля и надзора за ветеринарно-санитарным состоянием сибиреязвенных захоронений, закрепление за их территорией ответственного юридического лица, соблюдение требований санитарно-защитного зонирования;

3) проведение строгого предупредительного санитарного надзора при отводе земельных участков под строительство жилых массивов, промышленных объектов и введении в землепользование ранее неиспользованных и заброшенных территорий сибиреязвенных захоронений и скотомогильников;

4) проведение достоверного учета поголовья скота всех форм собственности, постоянный контроль за организацией и проведением плановой иммунизации СХЖ всех форм собственности в СНП и обеспечение высокого уровня охвата специфической профилактикой;

5) сбор и утилизация трупов павших животных в соответствии с действующими нормативными требованиями;

6) решение вопросов консервации сибиреязвенных захоронений и их санитарно-защитного зонирования;

7) постоянный санитарно-ветеринарный надзор и контроль за убоем сельскохозяйственных животных, реализацией мяса и продуктов животного происхождения;

8) контроль за соблюдением ветеринарно-санитарных правил при заготовке, хранении, транспортировке и обработке сырья животного происхождения;

9) информационно-разъяснительная работа среди населения СНП о мерах профилактики сибирской язвы.

Таким образом, эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по сибирской язве в Приморском крае за период 1919–2020 гг. считается относительно благополучной. За 102 года наблюдения сибирская язва зарегистрирована в течение 39 календарных лет. В 82 СНП 22 муниципальных образований края с 1930 по 2000 год зарегистрированы заболевания 173 СХЖ, из них 115 голов КРС (64,7 %), 49 лошадей (28,3 %), 8 свиней (4,6 %) и 1 животное без указания вида в эпизоотическом журнале. В период 1931–1979 гг. в крае сибирской язвой заболели 34 человека, из них умерли пятеро. Заболевания животных отмечались гораздо чаще в 1930-е гг., в середине 1950-х гг., вспышки сибирской язвы зарегистрированы в 1977 и 1979 гг. С учетом индекса эпизоотичности в Приморском крае выделены три зоны риска заражения возбудителем сибирской язвы, при этом зона потенциально высокого риска заражения возбудителем сибирской язвы охватывает девять районов на западе и юге края.

Согласно Перечню скотомогильников (2012 г.) учтены 12 СЯЗ в семи районах края. По итогам комплексного эпизоотологического и эпидемиологического обследования и экспертной оценки биологической опасности по сибирской язве, проведенных в 2013 г., решением Фрунзенского суда г. Владивостока от 28.05.2020 по делу № 2-1329/19 установлен и подтвержден факт отсутствия сибиреязвенных захоронений животных в восьми поселенческих и межпоселенческих территориях. Исследование культур *B. anthracis*, изолированных на территории Приморского края, показало их атипичность по отсутствию обеих плазмид вирулентности (pXO1/pXO2) и авирулентность к лабораторным животным. Штамм *B. anthracis* И-275 отнесен к одному из канонических SNP-кластеров – A.Br.008/009 глобальной генетической линии A (подгруппа A1). При районировании административных территорий Приморского края методом ранжирования выделены три группы эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия по сибирской язве. Рекомендован комплекс организационных профилактических противоэпизоотических и противоэпидемических мероприятий.

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

Работа выполнена в рамках НИР 1-1-18 «Совершенствование комплексного эпидемиологического мониторинга и профилактики сибирской язвы в Российской Федерации» (2018–2020 гг.). Номер государственной регистрации НИОКТР АААА-А18-118051890057-9. Выражаем благодарность за сотрудничество при сборе материалов и проведении полевых работ в 2013 г. специалистам ветеринарной службы Приморского края С.Е. Журавлеву и С.В. Антошиной.

Список литературы

1. Черкасский Б.Л., редактор. Кадастр стационарно-неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации: Справочник. М.: ОАО «ИНТЕРСЭН»; 2005. 829 с.
2. Рязанова А.Г., Скударева О.Н., Герасименко Д.К., Чмеренко Д.К., Семенова О.В., Аксенова Л.Ю., Еременко Е.И., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Печковский Г.А., Куличенко А.Н. Обзор эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве в 2020 г. в мире и прогноз на 2021 г. в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 1:81–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-81-86.
3. Попова А.Ю., Куличенко А.Н., редакторы. Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 году. Ижевск: ООО «Принт-2»; 2017. 313 с.
4. Селянинов Ю.О., Егоров И.Ю., Колбасов Д.В., Листищенко А.А. Сибирская язва на Ямале. Причины возникновения и проблемы диагностики. *Ветеринария*. 2016; 10:3–7.
5. Перечень скотомогильников (в том числе сибиреязвенных), расположенных на территории Российской Федерации (Центральный и Дальневосточный федеральные округа): Информ. изд. Ч. 2. М.: ФГБНУ «Росинформагротех»; 2012. 260 с.
6. Перечень скотомогильников (в том числе сибиреязвенных), расположенных на территории Российской Федерации (Сибирский федеральный округ): Информ. изд. Ч. 4. М.: ФГБНУ «Росинформагротех»; 2012. 176 с.
7. Куличенко А.Н., Буравцева Н.П., Рязанова А.Г., Еременко Е.И. Сибирская язва на Северном Кавказе. Майкоп: ООО «Качество»; 2016. 197 с.
8. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Куличенко А.Н., Рязанова А.Г., Буравцева Н.П., Еременко Е.И., Дятлов И.А., Малеев В.В., Симонова Е.Г., Картава С.А., Карнаухов И.Г., Топорков В.П. Пути совершенствования эпидемиологического надзора и контроля за сибирской язвой в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 1:84–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-84-88.
9. Дугаржапова З.Ф., Чеснокова М.В., Иванова Т.А., Косилко С.А., Балахонов С.В. Совершенствование методических подходов к обследованию сибиреязвенных захоронений и скотомогильников. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:41–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-41-47.
10. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: ИНТЕРСЭН; 2002. 384 с.
11. Горковенко Л.Е., Туркутоков В.Б., Оленов А.В., Борзов В.И. Сибирская язва в Приморском крае (1904–1980 гг.). *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2003; 2(12):54–5.

References

1. Cherkassky B.L., editor. [Cadastre of Stationary Potentially Hazardous as Regards Anthrax Areas in the Russian Federation]. Moscow: LLC "Intersen"; 2005. 829 p.
2. Ryazanova A.G., Skudareva O.N., Gerasimenko D.K., Chmerenko D.K., Semenova O.V., Aksanova L.Yu., Eremenko E.I., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Pechkovsky G.A., Kulichenko A.N. [Review of the epizootiological and epidemiological situation on anthrax around the world in 2020 and the forecast for 2021 in the Russian Federation]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (1):81–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-81-86.
3. Popova A.Yu., Kulichenko A.N., editors. [The Experience in Eradication of the Anthrax Outbreak in Yamal in 2016]. Izhevsk: LLC "Print-2"; 2017. 313 p.
4. Selyaninov Yu.O., Egorov I.Yu., Kolbasov D.V., Listishenko A.A. [Anthrax in Yamal. Causes of occurrence and problems of diagnosis]. *Veterinariya [Veterinary medicine]*. 2016; 10:3–7.
5. [Cadastre of Cattle Burial Grounds (Including Anthrax Burials) Located on the Territory of the Russian Federation (Central and Far Eastern Federal Districts): Inform. Ed.]. Part 2. Moscow: "Rosinformagrotech"; 2012. 260 p.
6. [Cadastre of Cattle Burial Grounds (Including Anthrax Burials) Located on the Territory of the Russian Federation (Siberian Federal District): Inform. Ed.]. Part 4. Moscow: "Rosinformagrotech"; 2012. 176 p.
7. Kulichenko A.N., Buravtseva N.P., Ryazanova A.G., Eremenko E.I. [Anthrax in the North Caucasus]. Maykop: LLC "Quality"; 2016. 197 p.
8. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Kulichenko A.N., Ryazanova A.G., Buravtseva N.P., Eremenko E.I., Dyatlov I.A., Maleev V.V., Simonova E.G., Kartavaya S.A., Karnaukhov I.G., Toporkov V.P. [Ways to improve the epidemiological surveillance and control of anthrax in the Russian Federation]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (1):84–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-84-88.

9. Dugarzhapova Z.F., Chesnokova M.V., Ivanova T.A., Kosilko S.A., Balakhonov S.V. [Improvement of methodical approaches to investigation of anthrax burials and animal burial sites]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (4):41–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-41-47.

10. Cherkassky B.L. *Epidemiology and Prevention of Anthrax*. Moscow: LLC “INTERSEN”; 2002. 384 p.

11. Gorkovenko L.E., Turkutyukov V.B., Olenov A.V., Borzov V.P. [Anthrax in the Primorsky Territory (1904–1980)]. *Tikhookeansky Meditsinsky Zhurnal [Pacific Medical Journal]*. 2003; 2(12):54–5.

Authors:

Dugarzhapova Z.F., Ivacheva M.A., Chesnokova M.V., Kravets E.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.

Reshetnyak E.A., Detkovskaya T.N. Rospotrebnadzor Administration in the Primorsky Territory. 3, Selskaya St., Vladivostok, 690087, Russian Federation. E-mail: web@pkrpn.ru.

Umanets A.A., Kuzin D.Yu. 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@pkrpn.ru.

Уманец А.А., Кузин Д.Ю. Государственная ветеринарная инспекция Приморского края. Российская Федерация, 692007, Владивосток, ул. 1-я Морская, 2. E-mail: uprvet@primorsky.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-79-83

УДК 616.98:579.841.95:616-07

А.Г. Кошкидько, С.А. Курчева, И.В. Жарникова, А.А. Зайцев, О.А. Гнусарева, О.Л. Старцева,
А.Ю. Газиева, Е.В. Жданова, Т.В. Жарникова, Д.В. Русанова

ОЦЕНКА ПРИМЕНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТАРНОГО ДИАГНОСТИКУМА (ЛИОФИЛИЗАТА) ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ

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

Туляремия – зоонозная болезнь, имеющая широкое географическое распространение, а ее возбудитель *Francisella tularensis* может быть использован в качестве биотеррористического агента. Цель исследования – оценка применения набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый сухой» («ДЭТ-Иг») с использованием контрольных тест-штаммов и полевого материала из природных очагов туляремии. **Материалы и методы.** С использованием предложенного эритроцитарного диагностикума проведено исследование обеззараженных культур тест-штаммов (*F. tularensis* Miura, *F. tularensis* 55, *F. tularensis* Schu, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *Brucella abortus* 544, *B. melitensis* 16-M, *B. suis* 1330 и *Yersinia enterocolitica* 64, *Y. enterocolitica* 178, *Y. enterocolitica* 383) и проб объектов окружающей среды, подозрительных на содержание *F. tularensis*. **Результаты и обсуждение.** Доказано, что разработанный диагностикум специфичен, чувствителен, прост в использовании при осуществлении рутинной диагностики туляремии. В ходе лабораторных испытаний экспериментальных серий набора реагентов «ДЭТ-Иг» показана возможность качественного определения возбудителя туляремии в бактериальных культурах, биологическом материале и объектах окружающей среды в реакции непрямой гемагглютинации. Сравнение результатов применения эритроцитарных диагностикумов в жидкой и лиофилизированной формах показало преимущества препаратов после лиофилизации: возможность транспортирования и длительного хранения при любых температурных режимах в различных климатических условиях; постановка реакции возможна без применения специальной разводящей жидкости. Установлен гарантийный срок хранения в течение двух лет (срок наблюдения). Полученные результаты указывают на перспективность внедрения разработанного препарата в практику здравоохранения.

Ключевые слова: реакция непрямой гемагглютинации, возбудитель туляремии, *Francisella tularensis*, природные очаги.

Корреспондирующий автор: Курчева Светлана Александровна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Кошкидько А.Г., Курчева С.А., Жарникова И.В., Зайцев А.А., Гнусарева О.А., Старцева О.Л., Газиева А.Ю., Жданова Е.В., Жарникова Т.В., Русанова Д.В. Оценка применения эритроцитарного диагностикума (лиофилизата) при выявлении возбудителя туляремии в природных очагах. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:79–83. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-79-83

Поступила 26.04.2021. Отправлена на доработку 17.05.2021. Принята к публ. 09.07.2021.

A.G. Koshkid'ko, S.A. Kurcheva, I.V. Zharnikova, A.A. Zaitsev, O.A. Gnusareva, O.L. Startseva,
A.Yu. Gazieva, E.V. Zhdanova, T.V. Zharnikova, D.V. Rusanova

Assessment of the Application of Erythrocytal Diagnosticum (Lyophilizate) in Detecting Tularemia Agent in Natural Foci

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. Tularemia is a zoonotic disease with a wide geographical dissemination, and its causative agent *Francisella tularensis* can be used as a bioterrorism agent. The aim of the study was to evaluate the use of a set of reagents “Erythrocytic immunoglobulin dry tularemia diagnosticum” (“DET-Ig”) with the help of control test strains and field material from natural tularemia foci. **Materials and methods.** Using the introduced erythrocyte diagnosticum, we studied the decontaminated cultures of test strains (*F. tularensis* Miura, *F. tularensis* 55, *F. tularensis* Schu, *F. tularensis* 15 NIEG, *Brucella abortus* 544, *B. melitensis* 16-M, *B. suis* 1330, and *Yersinia enterocolitica* 64, *Y. enterocolitica* 178, *Y. enterocolitica* 383) and environmental samples suspected of containing *F. tularensis*. **Results and discussion.** It has been proven that the developed diagnosticum is specific, sensitive, and easy to use for routine diagnostics of tularemia. In the course of laboratory tests of the experimental series of the DET-Ig reagent kit, the possibility of qualitative determination of the tularemia agent in bacterial cultures, biological material and environmental samples in the reaction of indirect hemagglutination was demonstrated. Comparison of the results of use of erythrocyte diagnosticum in liquid and lyophilized forms showed the advantages of drugs after lyophilization: the possibility of transportation and long-term storage at any temperature conditions in various climatic conditions; the setting of the reaction is possible without the use of special diluents. The guaranteed storage term is set for two years (observation period). The results obtained indicate the prospects of introducing the developed drug into healthcare practice.

Key words: indirect hemagglutination reaction, tularemia agent, *Francisella tularensis*, natural foci.

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

Corresponding author: Svetlana A. Kurcheva, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Citation: Koshkid'ko A.G., Kurcheva S.A., Zharnikova I.V., Zaitsev A.A., Gnusareva O.A., Startseva O.L., Gazieva A.Yu., Zhdanova E.V., Zharnikova T.V., Rusanova D.V. Assessment of the Application of Erythrocytal Diagnosticum (Lyophilizate) in Detecting Tularemia Agent in Natural Foci. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2021; 4:79–83. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-79-83

Received 26.04.2021. Revised 17.05.2021. Accepted 09.07.2021.

Koshkid'ko A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6617-9504>
Kurcheva S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3564-0791>
Zhamikova I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8443-4089>
Zaitsev A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2516-4813>
Gnusareva O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2516-4813>

Startseva O.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5493-5296>
Gazieva A.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8775-0087>
Zhdanova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5360-3786>
Zhamikova T.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0801-5077>
Rusanova D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2229-6570>

Francisella tularensis – возбудитель зоонозной болезни туляремии, которая характеризуется высокими показателями заболеваемости и смертности более чем у 190 различных видов млекопитающих, включая человека [1]. Согласно международной классификации бактерий вид *F. tularensis* включает четыре подвида с разнообразным географическим распределением, ареалами обитания и вирулентностью: subsp. *tularensis* (тип A), subsp. *holarctica* (тип B), subsp. *mediasiatica* и subsp. *novicida* [2]. *F. tularensis* subsp. *tularensis* встречается преимущественно в Северной Америке [3]. Штаммы *F. tularensis* subsp. *holarctica* распространены в Европе, Азии (в том числе Японии), Северной Америке, Австралии (включая Тасманию) [4, 5]. Географическое распространение *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* – Средняя Азия, а также территория Алтайского и Красноярского края Российской Федерации [5]. *F. tularensis* subsp. *novicida* выделен в Северной Америке, Австралии и Таиланде и считается неvirulentным для человека, единичные случаи выделения туляремиального микроба этого подвида от людей касались только лиц со сниженным иммунным статусом [5, 6]. В последнее время в 31 стране Европы, а также в Турции и Японии проводится обязательная регистрация случаев заболевания туляремией в связи с возможностью использования возбудителя в качестве агента биотерроризма, следовательно, это заболевание требует особого внимания [5, 7]. Естественным резервуаром инфекции являются мелкие млекопитающие, такие как мыши, полевки, белки и кролики. Передача инфекции людям происходит при контакте с инфицированными животными или загрязненной окружающей средой, употреблении зараженной пищи или воды, либо через укусы переносчиков – членистоногих [8, 9].

Учитывая неблагоприятную обстановку по туляремиальной инфекции в РФ, актуальным вопросом является разработка чувствительных и специфичных препаратов для лабораторной диагностики туляремии, которая основывается на обнаружении в сыворотке крови специфических антител и/или индикации *F. tularensis* в объектах окружающей среды и биологическом материале.

Иммуноанализ с помощью реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) позволяет получать предварительный результат через 3–4 ч от начала исследования [10]. Применяемые в настоящее время эритроцитарные диагностикумы в жидкой форме имеют ограниченный срок годности (1 год), с возможностью транспортирования только при строго определенном температурном режиме, хранение при минусовой температуре не допускается. Кроме того, для постановки РНГА с таким диагностикумом необходимы специальные растворы в качестве разводящей

жидкости, содержащие в своем составе нормальную кроличью сыворотку или Tween 80. Специалистами Ставропольского противочумного института разработан набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый сухой» («ДЭТ-Иг»). Для получения сухой формы диагностикума применен метод лиофильного высушивания, способствующий стабилизации основных диагностических характеристик компонентов. Это позволило увеличить срок годности набора до двух лет с возможностью его транспортировки в любых температурных режимах без потери специфической активности. Набор предназначен для обнаружения возбудителя туляремии в выделенных культурах, а также биологических пробах и пробах окружающей среды.

Цель исследовательской работы – оценка применения набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый сухой» с использованием контрольных тест-штаммов и полевого материала из природных очагов туляремии.

Материалы и методы

В работе использовали коммерческие и экспериментальные диагностические наборы производства Ставропольского противочумного института: набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый жидкий» («РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ»), набор реагентов «Тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (ИФА)» («ИФА-Тул-СтавНИПЧИ») и экспериментальные серии набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый сухой» («ДЭТ-Иг»).

Лиофилизацию препарата проводили по отработанному рентабельному режиму лиофилизации в глубоком вакууме: при 15–20 Па, температуре конденсатора минус 85 °С и плавном (до 25 °С) подводе тепла в течение 12–13 ч [11]. В состав среды высушивания входили полиглюкин, Tween 80 и азид натрия в дистиллированной воде.

Постановку РНГА и реакции торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА) осуществляли по традиционной методике макро- и микрометодом. Полученный лиофилизат восстанавливали в 1,0 мл физиологического раствора рН (6,2±0,2). РТНГА ставят обязательно параллельно с РНГА для подтверждения ее специфичности. Для постановки РТНГА использовали сыворотку туляремиальную агглютинирующую кроличью, входящую в состав набора, в разведении 1:500. Учет результатов РНГА и РТНГА (микрометод) проводили через 2 ч. Если в РТНГА титр реакции по сравнению с РНГА снижен на 4–6 лунок, значит, подтверждается специфичность РНГА [12].

При проведении контрольных исследований на чувствительность и специфичность разработанного лиофилизированного препарата использовали 10 штаммов: *F. tularensis holarctica* Miura, *F. tularensis mediaasiatica* 55, *F. tularensis nearctica* Schu, *F. tularensis holarctica* 15 НИИЭГ, *B. abortus* 544, *B. melitensis* 16-М, *B. suis* 1330 и *Y. enterocolitica* 64, *Y. enterocolitica* 178, *Y. enterocolitica* 383 – из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» Ставропольского противочумного института. При апробации в межлабораторных испытаниях исследовали пробы из объектов окружающей среды, взятые из природных очагов туляремии Ставропольского края:

- 10 проб экскрементов мышевидных грызунов, погадок хищных птиц, отобранных в период проведения эпизоотологического обследования Петровского района Ставропольского края с 14 по 15 января 2020 г.;

- 10 проб помета хищных млекопитающих, мумифицированный труп полевки, отобранные в период проведения эпизоотологического обследования Кировского и Минераловодского районов Ставропольского края с 27 по 30 марта 2020 г.;

- 26 проб экскрементов мышевидных грызунов, отобранных в период проведения эпизоотологического обследования Кировского, Советского, Георгиевского районов Ставропольского края с 21 по 31 июля 2020 г.;

- 7 проб погадок хищных птиц, отобранных в период проведения эпизоотологического обследования Кировского, Советского, Георгиевского районов Ставропольского края с 21 по 31 июля 2020 г.

Вследствие того, что идентификация *F. tularensis* subsp. *novicida* не регистрировалась у диких животных (здоровых или умирающих), а единственным источником изолятов *F. tularensis* subsp. *novicida* до настоящего времени являлась соленая вода, при оценке применения набора реагентов «ДЭТ-Иг» с использованием полевого материала из природных очагов туляремии (погадки хищных птиц, экскременты мышевидных грызунов, помет хищных млекопитающих) штаммы данного подвида не были представлены.

Результаты и обсуждение

В состав экспериментального набора «ДЭТ-Иг» входят: лиофилизированный в защитной среде высушивания диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый 10 % сухой, положительный контроль (инактивированная взвесь туляремийного микроба) и сыворотка туляремийная 1:10. Среда высушивания содержит не только ингредиенты, предохраняющие препарат от разрушения при замораживании и лиофилизации, но и Tween 80, позволяющий осуществлять постановку РНГА без разводящей жидкости, а также азид натрия – консервант, предотвращающий микробный

пророст при длительном хранении растворенного препарата.

Контроль качества экспериментальных серий «ДЭТ-Иг» производили после проведения процедуры лиофильного высушивания по следующим параметрам:

1. Растворимость – при добавлении 1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия диагностикум растворяется в течение 20 сек, имеет вид гомогенной суспензии красно-коричневого цвета; при отстаивании образуются два слоя: прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета надосадочная жидкость и плотный осадок красно-коричневого цвета.

2. Потеря в массе при высушивании – не более 2,5 %.

3. Отсутствие спонтанной агглютинации – при добавлении к 2,5 % взвеси диагностикума 0,9 % раствора хлорида натрия (1:1) через 3 ч формируется осадок в виде «пуговики».

4. Количество эритроцитов – при подсчете в камере Горяева в 1 мм³ 2,5 % диагностикума содержится $(5,6 \pm 0,5) \cdot 10^5$ эритроцитов.

5. Чувствительность – диагностикум обеспечивает выявление в РНГА *F. tularensis* в концентрациях, эквивалентных по отраслевому стандарту мутности ОСО 42-28-85 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, $3,9 \cdot 10^5$ м.к./мл макрометодом и $1,56 \cdot 10^6$ м.к./мл микрометодом.

6. Специфичность – при постановке РНГА с использованием диагностикума не выявляются гетерологичные микроорганизмы в концентрациях, эквивалентных по отраслевому стандарту мутности ОСО 42-28-85 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, $1 \cdot 10^8$ м.к./мл [13].

При положительном результате реакции сенсibilизированные эритроциты выпадают на дно лунки равномерным слоем в виде «зонтика», при отрицательном результате и контроле эритроциты оседают на дно лунки в виде «пуговики» или кольца [12].

При проведении контрольных лабораторных испытаний на чувствительность разработанного лиофилизированного препарата использовали обеззараженные микробные суспензии указанных выше штаммов *F. tularensis*, показавшие четкую агглютинацию эритроцитов в последнем разведении с концентрацией $1,95 \cdot 10^5$ – $3,9 \cdot 10^5$ м.к./мл макрометодом и $7,8 \cdot 10^5$ – $1,56 \cdot 10^6$ м.к./мл микрометодом. В постановке реакции с гетерологичными микроорганизмами получен отрицательный ответ в 100 % случаях (табл. 1). После лиофилизации качественные характеристики сухого эритроцитарного диагностикума остались без изменений. Внутривыпускная, межвыпускная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов составила 100 %.

Для подтверждения диагностической ценности проведены исследования полевого материала из природных очагов туляремии (табл. 2). Подготовку к исследованию проб проводили согласно инструкции по применению к препаратам.

Таблица 1 / Table 1

Контроль чувствительности и специфичности эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового диагностикума сухого (макрометод)
Control of the sensitivity and specificity of erythrocyte tularemia immunoglobulin dry diagnosticum (macro method)

Штаммы микроорганизмов Microorganism strains	№ серии / набора Batch / set No.								
	C-1			C-2			C-3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	Количество, м.к./мл ($n \cdot 10^5$) Quantity, m.c. / ml ($n \cdot 10^5$)								
<i>F. tularensis</i> Schu	1,95	1,95	1,95	3,9	3,9	3,9	1,95	1,95	1,95
<i>F. tularensis</i> Miura	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
<i>F. tularensis</i> 55	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	1,95	1,95	1,95
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95
<i>B. melitensis</i> 16-M, <i>B. abortus</i> 544, <i>B. suis</i> 1330, <i>Y. enterocolitica</i> 64, <i>Y. enterocolitica</i> 178, <i>Y. enterocolitica</i> 383	Результаты отрицательные Negative results								
Контроль диагностикума Diagnosticum control	Гемагглютинация отсутствует No hemagglutination								

При исследовании проб объектов окружающей среды (всего 53 пробы), отобранных в период проведения эпизоотологического обследования Ставропольского края (Петровский, Кировский, Советский, Минераловодский, Георгиевский районы) в 2020 г., в двух пробах обнаружен антиген возбудителя туляремии.

Параллельно с РНГА и РТНГА выявление возбудителя туляремии в чистых культурах и пробах из объектов окружающей среды проводили в иммуноферментном анализе. Результаты, полученные при исследованиях, подтверждают наличие туляремийного антигена в положительных пробах.

При изучении стабильности основных показателей качества разработанных эритроцитарных препаратов (лиофилизатов) учитывали температуры различ-

ных климатических зон, в которых предполагаются их реализация и использование. Проведены контрольные исследования полученных экспериментальных серий диагностикумов при хранении в потребительской упаковке с учетом регламентированной температуры от 2 до 8 °С, а также в условиях повышенных и пониженных температур при (30±2) °С и минус 18 °С соответственно. При постановке РНГА в контролируемых образцах отмечено полное сохранение первоначальных физико-химических свойств препарата, его чувствительности и специфичности на протяжении всего периода испытаний. Отрицательного влияния вышеуказанных температур на результаты контролируемых показателей не выявлено.

В ходе лабораторных испытаний экспериментальных серий набора реагентов «ДЭТ-Иг» установ-

Таблица 2 / Table 2

Положительные результаты серологического исследования полевого материала
Positive results of a serological study of field material

№ пробы Sample No.	Дата сбора Date of sample collection	Адрес сбора Site of sample collection	Биотоп, станция Biotope, station	Вид пробы Type of sample	Результат исследования Research result	
					«ДЭТ-Иг» “DET-Ig” reagent kit	«РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ» Conventional reagent kit
Петровский район Petrovsky district						
1	14.01.2020 January 14, 2020	с. Рогатая Балка Rogataya Balka 90° (B) N 4519737 E 043.02311	Разнотравно-злаковая степь Herb-cereal steppe	Экскременты полевков Vole excrements	РНГА – 1:320 РТНГА – 1:40 ИНАР – 1:320 ИНАИР– 1:40	РНГА – 1:320 РТНГА – 1:40 ИНАР – 1:320 ИНАИР – 1:40
2	14.01.2020 January 14, 2020	с. Рогатая Балка Rogataya Balka 90° (B) 6,53 km N 4520501 E 042.97536	Граница лесополосы и поля озимой пшеницы Border of the forest belt and the field of winter wheat	Погадка хищной птицы Regurgitate of a bird of prey	РНГА – 1:320 РТНГА – 1:80 ИНАР – 1:320 ИНАИР – 1:80	РНГА – 1:320 РТНГА – 1:80 ИНАР – 1:320 ИНАИР – 1:80

лено его соответствие назначению, а именно обнаружение возбудителя туляремии в выделенных бактериальных культурах, а также биологических пробах и объектах окружающей среды в реакции не прямой гемагглютинации микро- и макрометодом.

На основе сравнительной характеристики результатов применения эритроцитарных диагностикумов в жидкой и лиофилизированной формах можно сделать заключение, что препараты после лиофилизации имеют ряд преимуществ: реализуется возможность транспортирования и длительного хранения диагностикума при любых температурных режимах в различных климатических условиях; постановка реакции возможна без применения специальной разводящей жидкости; также установлен гарантийный срок хранения в течение двух лет (срок наблюдения).

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

Список литературы

- Zellner B., Huntley J.F. Ticks and tularemia: Do we know what we don't know? *Front Cell Infect. Microbiol.* 2019; 9:146. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00146.
- Sarva S.T., Waldo R.H., Belland R.J., Klose K.E. Comparative transcriptional analyses of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *PLoS One.* 2016; 11(8):e0158631. DOI: 10.1371/journal.pone.0158631.
- Farlow J., Wagner D.M., Dukerich M., Stanley M., Chu M., Kubota K., Petersen J., Keim P. *Francisella tularensis* in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(12):1835–41. DOI: 10.3201/eid1112.050728.
- Champion M.D., Zeng Q., Nix E.B., Nano F.E., Keim P., Kodira C.D., Borowsky M., Young S., Koehrsen M., Engels R., Pearson M., Howarth C., Larson L., White J., Alvarado L., Forsman M., Bearden S.W., Sjöstedt A., Titball R., Michell S.L., Birren B., Galagan J. Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog.* 2009; 5(5):e1000459. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000459.
- Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N. [Tularemia in the world]. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2021; 11(2):249–64. DOI: 10.15789/2220-7619-TTW-1380.
- Leelaporn A., Yongyod S., Limsrivanichakorn S., Yungyuen T., Kiratisin P. *Francisella novicida* bacteremia, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(12):1935–7. DOI: 10.3201/eid1412.080435.
- Chaignat V., Djordjevic-Spasic M., Ruettger A., Otto P., Klimpel D., Müller W., Sachse K., Araj G., Diller R., Tomaso H. Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14:234. DOI: 10.1186/1471-2334-14-234.
- Yanes H., Hennebique A., Pelloux I., Boisset S., Bicot D.J., Caspar Y., Maurin M. Evaluation of in-house and commercial serological tests for diagnosis of human tularemia. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 56(1):e01440-17. DOI: 10.1128/JCM.01440-17.
- Petersen J.M., Mead P.S., Schrieffer M.E. *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Vet. Res.* 2009; 40(2):7. DOI: 10.1051/vetres:2008045.
- Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Specific Indication of Pathogenic Biological Agents. Practice Guidelines]. 2nd ed., rev. and add. Saratov: LLC "Bukva"; 2014. 284 p.
- Koshkid'ko A.G., Kurcheva S.A., Zharnikova I.V., Startseva O.L. [Development of a protective drying medium to stabilize erythrocyte antigenic tularemia diagnosticum]. *Vestnik Biotekhnologii i Fiziko-Khimicheskoy Biologii Imeni Yu.A. Ovchinnikova [Bulletin of Biotechnology and Physical-Chemical Biology Named after Yu.A. Ovchinnikov]*. 2020; 16(4):12–6.
- Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. 2nd ed., rev. and add. Moscow: JSC "Shiko"; 2013. 560 p.
- Zharnikova I.V., Koshkid'ko A.G., Kurcheva S.A., Zhdanova E.V., Startseva O.L., Tyumentseva I.S., Afanas'ev E.N., Semirchova A.A., Geogdzhayana A.S., Krasovskaya T.L. [Method for the production of erythrocyte immunoglobulin tularemia diagnosticum]. RF patent No. 2747420, publ. 04.05.2021. Bul. No. 13.

Authors:

Koshkid'ko A.G., Kurcheva S.A., Zharnikova I.V., Zaitsev A.A., Gnusareva O.A., Startseva O.L., Gazieva A.Yu., Zhdanova E.V., Zharnikova T.V., Rusanova D.V. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Об авторах:

Кошкидько А.Г., Курчева С.А., Жарникова И.В., Зайцев А.А., Гнусарева О.А., Старцева О.Л., Газиева А.Ю., Жданова Е.В., Жарникова Т.В., Русанова Д.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-84-89

УДК 616.932:616-07

Л.В. Ларионова, Р.В. Писанов, Д.И. Симакова, А.Н. Наркевич, И.В. Архангельская

ПОЛИМЕРНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЙ ДИАГНОСТИКУМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЕГО ПРОДУКЦИИ ВИБРИОНАМИ

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

Маркером эпидемической значимости холерных вибрионов является их токсигенность, поэтому большое внимание в настоящее время уделяется созданию диагностических препаратов для выявления холерного токсина и оценки уровня его продукции. Иммуносуспензионная реакция агломерации объемная, проводимая с помощью латексных диагностикумов, является аналогом реакции непрямой гемагглютинации, доступным и простым в техническом отношении методом, так как не требует наличия специального оборудования и может быть использована при проведении исследований в полевых условиях. **Целью** исследования являлось конструирование полимерного иммуноглобулинового диагностикума для определения холерного токсина и уровня его продукции штаммами вибрионов. **Материалы и методы.** Холерный токсин получали из штамма-продуцента *Vibrio cholerae* Classical 569 B. Кроличью сыворотку к токсину получали по подобранной авторами методике. Полимерный диагностический иммуноглобулиновый антитоксический препарат получали путем сенсибилизации иммуноглобулинов из противохолерной антитоксической кроличьей сыворотки на поверхности полиакролеиновых микросфер размером $(1 \pm 0,1)$ мкм. **Результаты и обсуждение.** Аналитическая чувствительность разработанного диагностического препарата с контрольным холерным токсином составляет 100 нг/мл. Он выявляет холерный токсин у токсигенных штаммов холерного вибриона в титре 1:16 – 1:512, дает отрицательную реакцию с нетоксигенными штаммами *V. cholerae* O1, *V. cholerae* nonO1/nonO139, с образцами гетерологичных культур, препаратами ЛПС, жидкой питательной средой, используемой для культивирования *V. cholerae*. Таким образом, сконструирован полимерный иммуноглобулиновый диагностикум для выявления и количественной оценки продукции штаммами вибрионов холерного токсина, установлена его аналитическая чувствительность и специфичность.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холерный токсин, иммуноглобулин, полимерные микросферы, диагностикум, аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность.

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

Для цитирования: Ларионова Л.В., Писанов Р.В., Симакова Д.И., Наркевич А.Н., Архангельская И.В. Полимерный иммуноглобулиновый диагностикум для определения холерного токсина и оценки уровня его продукции вибрионами. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:84–89. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-84-89

Поступила 14.05.2020. Отправлена на доработку 02.03.2021. Принята к публ. 26.03.2021.

L.V. Larionova, R.V. Pisanov, D.I. Simakova, A.N. Narkevich, I.V. Arkhangel'skaya

Polimeric Immunoglobulin Diagnosticum for Detection of Cholera Toxin and Assessing the Level of Its Production by Vibrios

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

Abstract. A marker of the epidemic significance of *Vibrio cholerae* is their toxigenicity. Therefore, much attention is currently paid to the creation of diagnostic preparations for the detection of cholera toxin and assessment of the level of its production. The volumetric immunosuspension agglomeration reaction, carried out with the help of latex diagnosticums, is an analogue of the indirect hemagglutination reaction, an affordable and technically simple method, since it does not require special equipment and can be used when conducting research in the field. **The aim** of the study was to design a polymeric immunoglobulin diagnosticum for determining cholera toxin and the level of its production by vibrio strains. **Materials and methods.** Cholera toxin was obtained from the producer strain *Vibrio cholerae* Classical 569 B. Rabbit serum to the toxin was obtained according to the method selected by the authors. A polymeric diagnostic immunoglobulin antitoxic drug was obtained through sensitizing immunoglobulins from cholera antitoxic rabbit serum on the surface of polyacrolein microspheres with a size of $(1 \pm 0,1)$ μm . **Results and discussion.** The analytical sensitivity of the developed diagnostic preparation with control cholera toxin is 100 ng/ml. It detects cholera toxin in toxigenic strains of *Vibrio cholerae* in a titer of 1:16 – 1:512, gives negative results with non-toxigenic strains of *V. cholerae* O1, *V. cholerae* nonO1/nonO139, with samples of heterologous cultures, LPS preparations, liquid nutrient medium used for the cultivation of *V. cholerae*. Thus, a polymeric immunoglobulin diagnosticum has been constructed to detect and quantify the production of cholera toxin by vibrio strains, and its analytical sensitivity and specificity have been established.

Key words: *Vibrio cholerae*, cholera toxin, immunoglobulin, polymeric microspheres, diagnosticum, analytical sensitivity, analytical specificity.

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

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

Citation: Larionova L.V., Pisanov R.V., Simakova D.I., Narkevich A.N., Arkhangel'skaya I.V. Polimeric Immunoglobulin Diagnosticum for Detection of Cholera Toxin and Assessing the Level of Its Production by Vibrios. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:84–89. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-84-89

Received 14.05.2020. Revised 02.03.2021. Accepted 26.03.2021.

Larionova L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4645-4334>
Pisanov R.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>
Simakova D.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5598-5271>

Маркером эпидемической значимости холерного вибриона, независимо от принадлежности к O1 или O139 серогруппе, является его токсигенность, поэтому большое внимание в настоящее время уделяется созданию диагностических препаратов для выявления холерного токсина.

На сегодняшний день для выявления холерного токсина применяют различные методы: иммуноферментный анализ, спектроскопический анализ, метод масс-спектрометрии, выявление холерного токсина в культуре клеток, иммунофлюоресцентный метод с использованием ганглиозид-GM1-содержащей DASS-системы, реакцию коаггутинации, латекс-агглютинацию с антиХТ-сывороткой; методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования определяется наличие генов, кодирующих синтез холерного токсина, однако не определяется продукция холерного токсина. Для этих целей может быть использован анализ уровня мРНК с помощью количественной или цифровой ПЦР. Также разработан иммуносенсор, основанный на комбинированном использовании GM1-липосом и антител к холерным токсинам (ХТ) в проточной системе с регистрацией сигнала специфической флуоресценции [1–10]. Для выявления генов, отвечающих за синтез холерного токсина, применяется полимеразная цепная реакция, требующая специальных тест-систем и реагентов. Для оценки токсинопродукции также используется выделение РНК с обратной транскрипцией [11–14].

В то же время существуют диагностические препараты для определения биологических агентов (антигенов или антител) на основе полимерных окрашенных носителей в простой и весьма экономичной реакции агломерации объемной, которая относится к экспресс-методам диагностики [15–17]. Такие тесты характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью, простотой пробоподготовки, проведения анализа и учета результатов исследования.

Современные технологии позволяют получать синтетические носители определенных размеров с различными реакционно-способными группами на поверхности частиц, способными фиксировать антигены и антитела, что содействует получению стандартных и стабильных диагностических препаратов. Иммуносупензионная реакция агломерации объемная (РАО), проводимая при использовании латексных диагностикумов, по сути, является аналогом реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), доступным и простым в техническом отношении методом, так как не требует наличия специального оборудования и может быть использована при проведении исследований в полевых условиях.

Цель исследования – конструирование полимерного иммуноглобулинового диагностикума для определения холерного токсина и уровня его продукции штаммами вибрионов.

Материалы и методы

Культивирование холерных вибрионов.

Штамм-продуцент холерного токсина (*Vibrio cholerae* Classical 569 B) культивировали на жидкой питательной среде АК1 с интенсивной аэрацией при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Получение холерного токсина. Культуральную жидкость центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость переносили в чистую емкость и обеззараживали мертиолятом натрия до конечной концентрации 1:10000 с экспозицией 1 ч. К обеззараженной культуральной жидкости добавляли сульфат аммония до 50 % насыщения (рН 7,0). После центрифугирования раствора при 12 тыс. об/мин в течение 20 мин надосадочную жидкость сливали. Полученный осадок растворяли в 20 мМ фосфатном буферном растворе (рН 7,0) для ионообменной хроматографии. Хроматографическую очистку токсина проводили на FPLS Pathfinder-Duo Flow (Bio-Rad, США) на колонке UNO S12 повышающимся градиентом NaCl от 0 до 1 М. Токсин элюировался с колонки единственным пиком. После определения концентрации белка по методу Лоури полученный препарат разводили забуференным физиологическим раствором (ЗФР) и использовали для иммунизации.

Получение антитоксических сывороток. Для получения антитоксических сывороток использовали кроликов породы шиншилла весом 2,5–3,0 кг, которых иммунизировали по подобранной нами схеме. Все эксперименты с животными выполнялись в соответствии с законодательством Российской Федерации (приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23.08.2010 № 708н), Директивой Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Эксперименты осуществляли в соответствии с СП 1.3.3118-13.

Иммуноглобулины к холерному токсину из кроличьей сыворотки получали метаноловым методом. Для этого четыре части сыворотки разводили двумя частями ЗФР. Готовили метаноловую воду (6 мл метанола с 8 мл бидистиллированной воды). Стаканы для выделения иммуноглобулинов помещали на лед (0 °С), вносили в них сыворотку и хорошо перемешивали. Затем, покачивая стакан, постепенно вливали метаноловую воду и инкубировали при температуре минус 5 °С в течение 30–40 мин. После этого раствор центрифугировали (2 тыс. об/мин) в течение 20 мин при 0 °С. Осадок растворяли в половинном объеме ЗФР от исходного количества сыворотки. В полученном осадке определяли содержание белка по методу Лоури.

Полиакролеиновый микросферический носитель с альдегидными группами получали путем

синтеза акролеина в условиях одномоментно протекающей анионной и радикальной полимеризации в водно-щелочной среде. Окрашивание частиц сферической формы размером $(1,0 \pm 0,1)$ мкм производили внесением красителя тианин в процессе синтеза.

Далее полимерные микросферы сенсibilизировали антитоксическими иммуноглобулинами. Для этого 50 мг сфер отмывали 0,1 М боратным буфером (рН 8,4) и центрифугировали при 3 тыс. g при комнатной температуре в течение 15 мин. Осадок сфер суспендировали в 8 мл боратного буфера (рН 8,4), вносили 500 мкг белка иммуноглобулинов и инкубировали в течение 2 ч на электромагнитной мешалке, затем помещали в холодильник на 16–18 ч. После холодовой экспозиции к смеси добавляли 1 мл 1 % раствора желатозы, инкубировали в течение 2 ч на электромагнитной мешалке при комнатной температуре, отмывали трижды 3ФР. Полученный осадок суспендировали в 4 мл 0,1 % раствора желатозы. В результате проведенных исследований получен диагностикум полимерный холерный иммуноглобулиновый антитоксический *V. cholerae* O1 серогруппы с рабочим разведением 1:7.

Для повышения стабильности свойств и увеличения срока хранения разработанного диагностического препарата подобраны оптимальные условия его лиофилизации. Для этого жидкий диагностический препарат центрифугировали, осадок суспендировали в 3 % желатозо-сахарозной среде высушивания. Перед лиофилизацией проводили предварительное замораживание охлаждением в жидком азоте при температуре минус 196 °С в течение 1–2 мин. Затем флаконы с экспериментальным препаратом помещали в низкотемпературный шкаф (минус 45 ± 5 °С) для глубокого замораживания в течение 16 ч. Лيوфилизацию проводили в аппарате для лиофильного высушивания POWER-PL DRY-900 (Thermo Scientific) при вакуумном подогреве в течение 15 ч.

В ходе подготовки к проведению реакции агломерации объемной проводили подготовку реагентов. Лيوфилизированную нормальную кроличью сыворотку (НКС) растворяли в 5 мл 3ФР, получая разведение 1:100. Лيوфилизированный диагностикум суспендировали в 3,5 мл 3ФР, получая разведение 1:7. Контрольный раствор холерного токсина имел концентрацию 1 мг/мл.

Для постановки РАО в каждую U-образную лунку 96-луночного планшета для иммунологических реакций вносили 50 мкл НКС в разведении 1:100. Затем в первую лунку каждого ряда вносили 50 мкл холерного токсина в концентрации 1 мг/мл, получая концентрацию белка 500 мкг/мл, и двукратно титровали до конца ряда. Диагностикум в рабочем разведении вносили в объеме 25 мкл в каждую лунку и оставляли при комнатной температуре. Для контроля спонтанной агглютинации в две лунки вносили 50 мкл НКС и 25 мкл рабочего разведения диагностикума. Учет результатов осуществляли че-

рез 2–2,5 ч. За положительный результат принимали цветной голубой агломерат, равномерно выстилающий все дно лунки, или агломерат, выстилающий дно лунки с четко очерченными краями. В отрицательных случаях и в контроле образовывалось компактное колечко или «точка» в центре лунки.

Подобным образом исследовали бульонные питательные среды после культивирования в них различных штаммов холерного вибриона на наличие холерного токсина. Для этого взвеси холерного вибриона в жидкой питательной среде центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 30 мин, клеточный дебрис автоклавируют (121 °С; 1,5 атм в течение часа) и удаляли, надосадочную жидкость обеззараживали мертиолятом натрия до конечной концентрации 1:10000 с экспозицией 1 ч и исследовали в РАО с холерным полимерным иммуноглобулиновым антитоксическим диагностикумом. В качестве положительного контроля для определения чувствительности диагностикума использовали холерный токсин, выделенный и очищенный по описанной ранее методике.

Результаты и обсуждение

Кроликов иммунизировали препаратом холерного токсина по следующей схеме:

- 1-я иммунизация: 50 мкг в 0,5 мл 3ФР (рН 7,1) вводили в краевую вену уха и 50 мкг белка в 0,5 мл 3ФР + 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда подкожно в холку;

- 2-я иммунизация: через 14 дней 100 мкг белка в 0,5 мл 3ФР + 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда подкожно в холку;

- 3-я иммунизация: через 14 дней 50 мкг в 0,5 мл 3ФР вводили в краевую вену уха и 50 мкг белка в 0,5 мл 3ФР + 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда подкожно в холку.

Через 14 дней проводили пробный забор крови для определения титра антитоксических антител и затем забор крови для получения антитоксической сыворотки.

Титр антитоксических антител определяли методом GM1-ИФА [9]. Титр антитоксических антител составил 1:16000.

Полимерный диагностический иммуноглобулиновый антитоксический препарат получали путем сенсibilизации иммуноглобулинов из противохолерной антитоксической кроличьей сыворотки на поверхности полиакролеиновых микросфер размером $(1 \pm 0,1)$ мкм в дозе 1,0 мг белка на 100 мг полимерного носителя. Аналитическую чувствительность разработанного диагностикума исследовали в РАО по описанной методике. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) – минимальное количество антигена в образце, которое можно измерить с помощью анализа. Для этого препарат холерного токсина в дозе 1 мг белка/мл двукратно титровали в лунках полистиролового планшета для

Определение чувствительности и специфичности холерного полимерного иммуноглобулинового антитоксического диагностикума
Determination of the sensitivity and specificity of cholera polymeric immunoglobulin antitoxic diagnosticum

Наименование культуры Name of culture	Серогруппа Serogroup	Генетическая характеристика Genetic characterization	Титр холерного токсина в РАО Cholera toxin titer in VAR
<i>V. cholerae</i> Classical 1088 (569 B) Inaba	O1	ctxA+, tcpA+	1:64
<i>V. cholerae</i> Classical 1310	O1	ctxA+, tcpA+	1:32
<i>V. cholerae</i> Classical 698	O1	ctxA+, tcpA+	1:64
<i>V. cholerae</i> El Tor 12214 (M-878) Ogawa	O1	ctxA+, tcpA+	1:512
<i>V. cholerae</i> El Tor 5879	O1	ctxA+, tcpA+	1:256
<i>V. cholerae</i> 16064	O139	ctxA+, tcpA+	1:32
<i>V. cholerae</i> 16065	O139	ctxA+, tcpA+	1:16
<i>V. cholerae</i> 16068	O139	ctxA+, tcpA+	1:64
<i>V. cholerae</i> 16076	O139	ctxA+, tcpA+	1:32
<i>V. cholerae</i> 16131	O139	ctxA+, tcpA+	1:16
<i>V. cholerae</i> 17259	O139	ctxA+, tcpA+	1:32
<i>V. cholerae</i> El Tor 17751	O1	ctxA–, tcpA+	отрицательно / none
<i>V. cholerae</i> El Tor 18963 (preCTX)	O1	ctxA–, tcpA+	отрицательно / none
<i>V. cholerae</i> El Tor 14863	O1	ctxA–, tcpA–	отрицательно / none
<i>Escherichia coli</i>	–	–	отрицательно / none
<i>Klebsiella pneumonia</i>	–	–	отрицательно / none
<i>Enterococcus faecalis</i>	–	–	отрицательно / none
ЛПС <i>V. cholerae</i> El Tor LPS <i>V. cholerae</i> El Tor	–	–	отрицательно / none
Жидкая питательная среда Liquid culture medium	–	–	отрицательно / none

иммунологических реакций, начиная с 500 мкг белка в первом разведении. Последнее разведение препарата, в котором фиксировали положительную реакцию, соответствовало 100 нг белка. Таким образом, аналитическая чувствительность диагностикума полимерного иммуноглобулинового антитоксического составляет 100 нг/мл.

При изучении специфичности разработанного диагностикума в РАО использовали бульонные питательные среды после культивирования различных штаммов *V. cholerae*. Аналитическая специфичность характеризует способность диагностического препарата определять специфический антиген *V. cholerae*. Для определения аналитической специфичности использованы обеззараженные мертиолятом натрия (1:10000) культуральные жидкости токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, гетерологичные культуры *Escherichia coli* (коммерческий, нетоксигенный штамм), *Klebsiella pneumonia* и *Enterococcus faecalis*. При проведении РАО исследуемые образцы не требовали предварительного разведения. Отрицательным контролем служили препараты холерного липополисахарида и жидкая питательная среда. РАО ставили по общеизвестной методике. Результаты реакции учитывали через 2 ч (таблица).

Результаты исследования токсигенности штаммов *V. cholerae* в РАО показали, что разработанный диагностический препарат выявляет холерный токсин у токсигенных штаммов в титре 1:16 – 1:512,

дает отрицательную реакцию с нетоксигенными штаммами и ЛПС *V. cholerae*, образцами гетерологичных культур и жидкой питательной средой.

Исследование контрольного препарата холерного токсина в реакции агломерации объемной показало, что чувствительность разработанного диагностического препарата составляет 100 нг/мл.

Используя полученные данные аналитической чувствительности диагностикума и титров токсина в РАО, возможно проведение количественной оценки токсинопродукции холерного вибриона [18, 19].

Для этого можно предложить следующую формулу:

$$K = P \cdot C,$$

где K – искомая концентрация холерного токсина; P – последнее разведение исследуемой жидкости, в котором фиксировался положительный результат; C – чувствительность диагностикума, нг/мл.

Например, токсинопродукция *V. cholerae* Classical 1088 (569 B) Инаба составит:

$$K = P \cdot C; 64 \cdot 100 = 6,4 \text{ мкг/мл.}$$

В результате проведенных исследований сконструирован полимерный иммуноглобулиновый анти-токсический диагностический препарат, позволяющий определять холерный токсин и оценивать уровень его продукции *V. cholerae* в качественном и количественном выражении в простой одностадийной реакции агломерации объемной с визуальным учетом результатов через 2 ч. Аналитическая чувствитель-

ность диагностикума – 100 нг белка/мл. Полученный диагностикум специфичен: выявляет холерный токсин у токсигенных штаммов *V. cholerae* – титр в РАО составляет 1:16 – 1:512, при этом с нетоксигенными штаммами *V. cholerae* и гетерологичными культурами реакция отрицательная.

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

Список литературы

1. WHO – Global Task Force on Cholera Control Target Product Profile (TPP) for the development of improved Cholera rapid diagnostic tests. June 2017. [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/cholera/task_force/cholera-rapid-diagnostic-test.pdf (дата обращения 20.03.2020).
2. ВОЗ. Стандарты эпиднадзора за управляемыми инфекциями. Холера. Сентябрь 2018. [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/docs/default-source/immunization/vpd_surveillance/vpd-surveillance-standards-publication/02-who-surveillance-vaccine-preventable-02-cholera-russian-r1.pdf?sfvrsn=a110ae17_10 (дата обращения 20.03.2020).
3. Sanchez J., Holmgren J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cell Mol. Life Sci.* 2008; 65(9):1347–60. DOI: 10.1007/s00018-008-7496-5.
4. Sanchez J., Holmgren J. Cholera toxin – a foe & a friend. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133(2):153–63.
5. Смирнова Н.И., Агафонова Н.А., Щелканова Е.Ю., Рыбальченко Д.А., Крицкий А.А., Альхова Ж.В., Краснов Я.М., Агафонова Е.Ю., Кутырев В.В. Структурные и функциональные изменения генома авирулентных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор ctxA+, tcpA+. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2020; 38(3):108–19. DOI: 10.17116/molgen202038031108.
6. Ho J.A., Wu L.C., Huang M.R., Lin Y.J., Baeumner A.J., Durst R.A. Application of ganglioside-sensitized liposomes in flow injection immunoanalytical system for the determination of cholera toxin. *Anal. Chem.* 2007; 79(1):246–50. DOI: 10.1021/ac060889n.
7. Tuteja U., Kumar S., Shukla J., Kingston J., Batra H.V. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxicogenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56(Pt 10):1340–5. DOI: 10.1099/jmm.0.47166-0.
8. Терешкина Н.Е., Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Адамов А.К., Григорьева Г.В. Иммунодиагностика холеры: современное состояние проблемы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010; 1(103):18–23.
9. Горяев А.А., Щелканова Е.Ю., Лозовский Ю.В., Тучков И.В., Смирнова Н.И. Конструирование штамма *Vibrio cholerae* биовара эльтор гиперпродукента холерного токсина II типа и определение оптимальных условий для продукции этого белка. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008; 1(95):56–9.
10. Германчук В.Г., Уткин Д.В., Спицин А.Н., Михеева Е.А., Осина Н.А. Применение методов спектроскопического анализа для выявления холерного токсина. *Здоровье населения и среда обитания*. 2016; 6:40–3.
11. Шашкова А.В., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Конструирование ПЦР тест-системы для идентификации токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, определения их биовара и дифференциации штаммов эльтор вибрионов на типичные и измененные. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011; 4(110):49–52. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-49-52.
12. Полеева М.В., Чемисова О.С. Использование масс-спектрометрического анализа для детекции бактериальных токсинов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2018; 1:93–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-1-93-101.
13. Гаева А.В., Громова О.В., Дуракова О.С., Генералов С.В., Волох О.А. Современные подходы к контролю активных компонентов холерной химической вакцины. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018; 1:152–7.
14. 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 Suppl 1:A73–A82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.
15. Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Симакова Д.И. Роль малых РНК в контроле экспрессии генов, вовлеченных в реализацию патогенности *Vibrio cholerae*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 2:36–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-36-39.
16. Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Агафонова В.В., Терентьев А.Н., Карбышев Г.Л. Конструирование антилипазного иммуноглобулинового полимерного диагностикума для вы-

явления штаммов холерных вибрионов эльтор, обладающих гемолитической и липазной активностью. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2006; 1:57–60.

17. Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Люкшина Е.Ю., Наркевич А.Н., Архангельская И.В., Меньшикова Е.А. Применение полимерных антигенных диагностикумов для выявления противохолерных антител в сыворотках крови больных. *Заметки ученого*. 2016; 2:78–80.

18. Ларионова Л.В., Наркевич А.Н., Симакова Д.И., Кочеткова А.П., Лысова Л.К., Люкшина Е.Ю. Способ получения диагностикума для количественного определения лечебного рекомбинантного α -интерферона в сыворотке крови больных вирусными инфекциями. Патент РФ № 2605621, опублик. 27.12.2016. Бюл. № 36.

19. Симакова Д.И., Писанов Р.В., Ларионова Л.В., Наркевич А.Н. Способ получения диагностикума для определения токсина холерного вибриона, выделенного из объектов окружающей среды. Патент РФ № 2703282, опублик. 16.10.2019. Бюл. № 29.

References

1. WHO – Global Task Force on Cholera Control Target Product Profile (TPP) for the development of improved Cholera rapid diagnostic tests. June 2017. (Cited 20 Mar 2020). [Internet]. Available from: https://www.who.int/cholera/task_force/cholera-rapid-diagnostic-test.pdf.
2. WHO. Surveillance standards for vaccine-preventable diseases. Cholera. September 2018. (Cited 20 Mar 2020). [Internet]. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/immunization/vpd_surveillance/vpd-surveillance-standards-publication/02-who-surveillance-vaccine-preventable-02-cholera-russian-r1.pdf?sfvrsn=a110ae17_10.
3. Sanchez J., Holmgren J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cell Mol. Life Sci.* 2008; 65(9):1347–60. DOI: 10.1007/s00018-008-7496-5.
4. Sanchez J., Holmgren J. Cholera toxin – a foe & a friend. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133(2):153–63.
5. Smirnova N.I., Agafonova N.A., Shchelkanova E.Yu., Rybalchenko D.A., Kritsky A.A., Alkhova Zh.V., Krasnov Ya.M., Agafonova E.Yu., Kutyrev V.V. [Structural and functional changes in the genome of avirulent El Tor biovar *Vibrio cholerae* ctxA+, tcpA+ strains]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2020; 38(3):108–19. DOI: 10.17116/molgen202038031108.
6. Ho J.A., Wu L.C., Huang M.R., Lin Y.J., Baeumner A.J., Durst R.A. Application of ganglioside-sensitized liposomes in flow injection immunoanalytical system for the determination of cholera toxin. *Anal. Chem.* 2007; 79(1):246–50. DOI: 10.1021/ac060889n.
7. Tuteja U., Kumar S., Shukla J., Kingston J., Batra H.V. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxicogenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56(Pt 10):1340–5. DOI: 10.1099/jmm.0.47166-0.
8. Tereshkina N.E., Mikhayeva E.A., Devdariani Z.L., Adamov A.K., Grigoryeva G.V. [Immunodiagnosics of cholera: current state of the problem]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2010; 1(103):18–23. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-1(103)-18-23.
9. Goryaev A.A., Shchelkanova E.Yu., Lozovsky Yu.V., Touchkov I.V., Smirnova N.I. [Construction of an El Tor biovariant *Vibrio cholerae* strain capable of type II cholera toxin hyperproduction and determining the optimal conditions for the production of this protein]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2008; 1(95):56–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-1(95)-56-59.
10. Germanchuk V.G., Utkin D.V., Spitsin A.N., Mikhayeva E.A., Osina N.A. [Application of spectroscopic analysis for detection of cholera toxin]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Social Environment]*. 2016; 6:40–3.
11. Shashkova A.V., Goryaev A.A., Zadnova S.P., Krasnov Y.M., Smirnova N.I., Kutyrev V.V. [Construction of the PCR test-system for the detection of *Vibrio cholerae* O1 toxigenic strains, for indication of their biovar and for differentiation between typical and altered El Tor vibrio strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2011; 4(110):49–52. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-49-52.
12. Poleeva M.V., Chemisova O.S. [The use of mass spectrometric analysis for the detection of bacterial toxins]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2018; 1:93–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-1-93-101.
13. Gaeva A.V., Gromova O.V., Durakova O.S., Generalov S.V., Volokh O.A. [Modern approaches to the control of active components of the chemical cholera vaccine]. *Razrabotka i Registratsiya Lekarnykh Sredstv [Development and Registration of Medicines]*. 2018; 1:152–7.
14. 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 Suppl 1:A73-A82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.

15. Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Simakova D.I. [The role of small RNAs in controlling expression of genes involved in the implementation of *Vibrio cholerae* pathogenicity]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; (2):36–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-36-39.

16. Telesmanich N.R., Lomov Yu.M., Agafonova V.V., Terentyev A.N., Karbyshev G.L. [Construction of anti-lipase immunoglobulin polymeric diagnosticum for the detection of *Vibrio cholerae* El Tor strains with hemolytic and lipase activity]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2006; 1:57–60.

17. Larionova L.V., Simakova D.I., Lyukshina E.Yu., Narkevich A.N., Arkhangelskaya I.V., Menshikova E.A. [The use of polymeric antigenic diagnostic kits for the detection of cholera antibodies in the sera of patients]. *Zametki Uchenogo* [Scientist's Notes]. 2016; 2:78–80.

18. Larionova L.V., Narkevich A.N., Simakova D.I., Kochetkova A.P., Lysova L.K., Lyukshina E.Yu. [A method for production of a diagnosticum for the quantitative determination of

therapeutic recombinant α -interferon in the blood serum of patients with viral infections]. RF patent No. 2605621, publ. 27.12.2016. Bul. No. 36.

19. Simakova D.I., Pisanov R.V., Larionova L.V., Narkevich A.N. [A method for production of a diagnosticum for the determination of *Vibrio cholerae* toxin isolated from environmental objects]. RF patent No. 2703282, publ. 16.10.2019. Bul. No. 29.

Authors:

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

Об авторах:

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

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-90-95

УДК 616.98:579.842.23:616-07

К.А. Никифоров, Л.М. Куклева, Д.А. Ситмбетов, Н.А. Осина, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев

КОНСТРУИРОВАНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ГЕНПЕСТ-ПОДВИД/АЛТАЙ-РГФ»

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

Цель – разработка набора реагентов, позволяющего проводить детекцию ДНК возбудителя чумы в пробах клинического и биологического материала, объектов окружающей среды с одновременным определением его принадлежности к основному и неосновным подвидам, дифференциацией отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида. **Материалы и методы.** На специфические генетические маркеры подобраны комплекты праймеров с помощью программы VectorNTI 10, определены оптимальные условия проведения полимеразной цепной реакции для приборов типа RotorGene. Для оценки специфичности и чувствительности разработанного набора реагентов использовано 44 штамма микроорганизмов, из которых 19 *Yersinia pestis* и 25 штаммов гетерологичных микроорганизмов. Диагностическая чувствительность «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» – не менее 98,6 % при доверительной вероятности 91 %. Диагностическая специфичность «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» – не менее 99 % при доверительной вероятности 91 %. **Результаты и обсуждение.** Разработано медицинское изделие «Набор реагентов для выявления и дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов (отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида) методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (ГенПест-подвид/алтай-РГФ)». Набор реагентов прошел государственную регистрацию в установленном порядке. Применение разработанного набора реагентов является актуальным для Горно-Алтайского высокогорного очага чумы РФ и сопредельной части Монголии.

Ключевые слова: чума, возбудитель чумы, подвидовая дифференциация, алтайский биовар, центральноазиатский подвид, ПЦР-тест-система.

Корреспондирующий автор: Никифоров Константин Алексеевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Никифоров К.А., Куклева Л.М., Ситмбетов Д.А., Осина Н.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Конструирование набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ». Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 4:90–95. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-90-95

Поступила 04.03.2021. Отправлена на доработку 25.10.2021. Принята к публ. 15.11.2021.

K.A. Nikiforov, L.M. Kukleva, D.A. Sitmbetov, N.A. Osina, G.A. Eroshenko, V.V. Kutyrev

Construction of the Reagent Panel “GenPest-subspecies/Altai-RGF”

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

Abstract. The aim of the study was to develop a test system that allows for detecting plague pathogen DNA in clinical and biological samples, environmental objects with the simultaneous determination of its appurtenance to the main and non-main subspecies, differentiation of the altai biovar *central asiatica* subspecies separately. **Materials and methods.** Primer sets for specific genetic markers have been selected using the VectorNTI 10 software, optimal conditions for PCR were determined for RotorGene devices. To assess the specificity and sensitivity of the developed set of reagents, 44 strains of microorganisms were used, of which 19 were *Yersinia pestis* strains and 25 strains of heterologous microorganisms. The diagnostic sensitivity of “GenPest-subspecies/Altai-RGF” is 98.6 % with a confidence level of probability of 91 %. The diagnostic specificity of “GenPest-subspecies/Altai-RGF” is ≥ 99 % with a confidence level of 91 %. **Results and discussion.** A medical product “A set of reagents for the detection and differentiation of plague pathogen strains of the main and non-main subspecies (altai biovar, subspecies *central asiatica* exclusively) by the polymerase chain reaction with hybridization-fluorescent registration of results in real-time mode (GenPest-subspecies/Altai-RGF)” has been developed. The set of reagents passed the state registration in accordance with the established procedure. The use of the developed set of reagents is relevant for the Gorno-Altai high-mountain plague focus of the Russian Federation and the adjacent part of Mongolia.

Key words: plague, plague agent, subspecies differentiation, altai biovar, subspecies *central asiatica*, PCR test system.

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

Corresponding author: Konstantin A. Nikiforov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sitmbetov D.A., Osina N.A., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Construction of the Reagent Panel “GenPest-subspecies/Altai-RGF”. *Problems of Especially Dangerous Infections*. 2021; 4:90–95. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-90-95

Received 04.03.2021. Revised 25.10.2021. Accepted 15.11.2021.

Nikiforov K.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4115-9486>

Kukleva L.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>

Osina N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0954-5683>

Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>

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

Чума представляет собой зооантропонозную бактериальную особо опасную инфекцию. Природные очаги чумы описаны в разнообразных ландшафтно-географических зонах. На территории

стран СНГ и ближнего зарубежья находятся 45 природных очагов чумы [1]. Штаммы *Yersinia pestis* отличаются по вирулентности, эпидемиологической значимости и биохимическим свойствам.

До недавнего времени в Российской Федерации применялась внутривидовая классификация возбудителя чумы, в соответствии с которой вид *Y. pestis* разделялся на пять подвидов – основной и неосновные: кавказский (штаммы которого уникальны для Кавказского региона, занимающего территорию РФ, Азербайджана, Армении и Грузии); алтайский (штаммы которого распространены в Алтайских горах РФ и Монголии); гиссарский (штаммы которого циркулируют только на территории Таджикистана); улегейский (штаммы которого описаны только на территории Монголии). В 2018 г. осуществлено усовершенствование внутривидовой классификации *Y. pestis*, согласно которой описываются семь подвидов: основной, ангольский (0.PE3), кавказский (0.PE2), тибетский (0.PE7), улегейский (0.PE5), центральноазиатский (0.PE4) и цинхайский (0.PE10). Центральноазиатский подвид объединяет четыре биовара: алтайский (0.PE4a), гиссарский (0.PE4h), таласский (0.PE4t) и *microtus* (0.PE4m) [2, 3]. Усовершенствованная классификация *Y. pestis* обсуждалась и получила одобрение на Межведомственном совещании по санитарной охране территории Российской Федерации в Саратове 12–13 декабря 2019 г. Штаммы основного подвида отличаются от штаммов неосновных подвида высокими вирулентностью и эпидемической значимостью.

В 2014–2016 гг. в Горно-Алтайском высокогорном очаге на территории Республики Алтай впервые официально подтверждены случаи чумы человека [4, 5]. Ранее в данном очаге отмечалась циркуляция только штаммов алтайского биовара центральноазиатского подвида (ранее – алтайский подвид), который, согласно имеющимся данным, никогда не вызывал случаев чумы у людей. Сейчас в Горно-Алтайском высокогорном очаге отмечается одновременная циркуляция как штаммов основного подвида, так и алтайского биовара центральноазиатского подвида, различных по вирулентности и эпидемической значимости. На основании перечисленных выше фактов актуальной становится задача по созданию быстрого и эффективного способа дифференциации основного и неосновных подвида, отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида.

Перспективным молекулярно-генетическим методом решения этой задачи является полимеразная цепная реакция с учетом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [6–9]. Метод ПЦР-РВ массово используется для выявления и ускоренной идентификации штаммов чумного микроба [7, 8, 10]. Разработаны и зарегистрированы в установленном порядке тест-системы для молекулярной диагностики чумы: набор реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени «Ген *Yersinia pestis* индикация-РГФ» (регистрационное удостоверение ФСР 2011/12106); набор реагентов для ускоренной идентификации штаммов *Y. pestis*

методом мультислоковой ПЦР в режиме реального времени «Ген *Y. pestis* идентификация – РГФ» (рег. уд. ФСР 2011/12105); набор реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis* в биологическом материале от людей и животных, в блохах и клещах, пометах птиц и почве методом ПЦР-РВ «АмплиСенс *Yersinia pestis*-FL» (рег. уд. ФСР 2012/13303); набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителя чумы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «ОМ-Скрин-Чума-РВ» (рег. уд. РЗН 2015/2993). Однако данные препараты не позволяют одновременно выявить патоген и определить его принадлежность к основному подвиду или алтайскому биовару центральноазиатского подвида, что важно при проведении молекулярно-эпидемиологического мониторинга *Y. pestis* в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге.

Цель этого исследования заключалась в создании набора реагентов по детекции ДНК *Y. pestis* в пробах клинического и биологического материала, объектов окружающей среды параллельно с выяснением принадлежности к основному и неосновным подвидам и отдельной дифференциацией алтайского биовара центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ.

Материалы и методы

Штаммы. В исследовании применено 44 штамма микроорганизмов, из которых: 19 – *Y. pestis*, 2 – *Y. pseudotuberculosis*, 1 – *Y. enterocolitica*, 1 – *Enterobacter kobei*, 1 – *E. faecal*, 1 – *E. cloacae*, 1 – *Legionella pneumophila*, 3 – *Escherichia coli*, 1 – *Staphylococcus epidermidis*, 2 – *Listeria monocytogenes*, 1 – *E. aerogenes*, 1 – *Citrobacter braakii*, 1 – *C. youngae*, 1 – *S. aureus*, 1 – *Salmonella enteritidis*, 1 – *S. saprophyticus*, 1 – *Pseudomonas aeruginosa*, 1 – *Shigella flexneri*, 1 – *S. gallinarum*, 1 – *Proteus mirabilis*, 1 – *P. vulgaris*, 1 – *Klebsiella pneumoniae*. Все использованные штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Выращивание штаммов, определение их биохимических свойств выполняли согласно общепринятым методикам [11] в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Из культур микроорганизмов делали суспензии в растворе хлористого натрия согласно стандартному образцу мутности в 10 ед. ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ОСО 42-28-59-86П), что аналогично концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к./мл. После этого получали 10-кратные разведения суспензий до итоговых концентраций $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^3$ и $1 \cdot 10^2$ м.к./мл. Количество клеток в этих разведениях определяли, проводя высевы на три чашки Петри с необходимой средой.

Оценку специфичности и чувствительности разрабатываемого набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» проводили с использованием имитации

проб клинического материала (кровь, ликвор, мокрота, моча и фекалии), биоматериалов (блохи, клещи, мазки и суспензии органов животных, погадки птиц, экскременты животных) и объектов окружающей среды (почва), искусственно контаминированных штаммами *Y. pestis* и гетерологичных микроорганизмов, соответственно в концентрациях $1 \cdot 10^3$ и $1 \cdot 10^4$ м.к./мл.

Обеззараживание проб и выделение ДНК. Обеззараживание проб выполняли в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» путем добавления мертиолята натрия до достижения итоговой концентрации 0,01 %, затем инкубировали при 56 °C 30 мин. После этого вносили 100 мкл полученной суспензии в лизирующий буфер, содержащий 6 молей гуанидинизотиоцианата, и прогревали при 65 °C 15 мин. Выделение ДНК проводили с использованием набора «ДНК-сорбВ» в строгом соответствии с инструкцией.

Проведение ПЦР. ПЦР-РВ выполняли на амплификаторе типа RotorGene (Qiagen, Германия). Учет флуоресценции выполнялся во время отжига праймеров с порогом 0,05.

Расчет праймеров. Конструирование праймеров и зондов осуществляли с использованием программы VectorNTI 10 (<http://www.thermofisher.com>). Для оценки гомологии нуклеотидных последовательностей применяли алгоритм BLAST и базу данных GenBank NCBI.

Результаты и обсуждение

Первоначально осуществлен анализ нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pestis*, представленных в международной базе данных GenBank NCBI, публикаций отечественных и зарубежных коллег для поиска ДНК-мишеней, перспективных для проведения детекции и внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* в пробах клинического, биологического материала и объектов окружающей среды. Для индикации ДНК *Y. pestis* в исследуемом материале представляется перспективным использование хромосомного видоспецифичного гена *yihN* [11]. Дифференциация штаммов основного подвида *Y. pestis* возможна на основании выявления характерной для данного подвида делеции размером 89 п.н. в гене *ilvN*, а алтайского биовара центральноазиатского подвида *Y. pestis* – делеции размером 90 п.н. в локусе AK38 1327 [12]. Для осуществления амплификации фрагментов указанных генов в режиме реального времени подобраны специфические праймеры и зонды, причем в двух последних случаях последовательность зонда комплементарна области делеции. Для проведения исследований предложено использовать две реакционные смеси (РС): «РС-вид» для проведения амплификации фрагмента гена *yihN* с образованием флуоресценции по каналу FAM, «РС-подвид» – амплификация фрагментов генов *ilvN* и AK38 1327 с наличием флуоресцентного сигнала по каналам FAM и JOE соответственно (табл. 1).

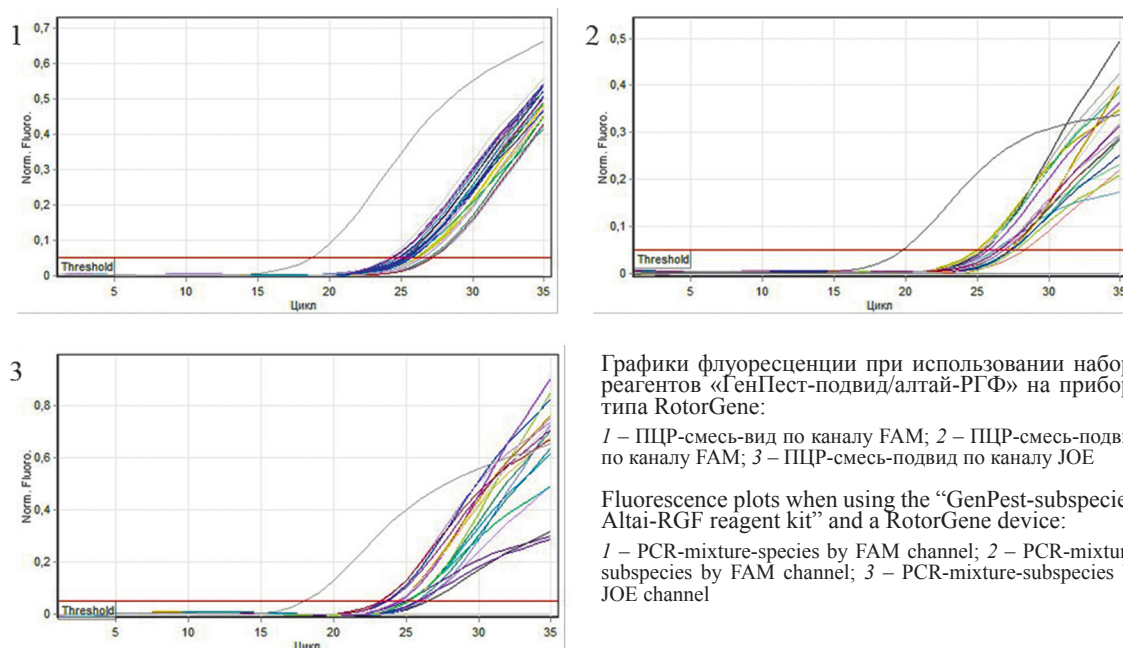
Экспериментальным путем подобраны оптимальные условия для проведения ПЦР-РВ с вы-

Таблица 1 / Table 1

Интерпретация результатов проведения ПЦР-РВ с использованием реакционных смесей РС-вид и РС-подвид на приборах типа RotorGene

Interpretation of the results of RT-PCR using reaction mixtures RM-species and RM-subspecies on RotorGene devices

Значения порогового цикла (Ct) по каналам и реакционным смесям Cycle threshold (Ct) values by channel and reaction mixture			Результат анализа Results of analysis
PC-вид RM-species	PC-подвид RM-subspecies		
FAM/Green	FAM/Green	JOE/Yellow	
<i>yihN</i>	<i>ilvN</i>	AK38_1327	
<26	–	<25	В пробе выявлена ДНК штамма <i>Y. pestis</i> основного подвида The sample contains the DNA of <i>Y. pestis</i> strain of the main subspecies
<26	<28	–	В пробе выявлена ДНК штамма <i>Y. pestis</i> алтайского биовара центральноазиатского подвида The sample contains DNA of <i>Y. pestis</i> strain of the altai biovar, subspecies <i>central asiatica</i>
<26	<28	<25	В пробе выявлена ДНК штамма <i>Y. pestis</i> неосновных (кроме алтайского биовара центральноазиатского подвида) подвигов The sample contains DNA of <i>Y. pestis</i> strain of non-main subspecies (except for the altai biovar of the subspecies <i>central asiatica</i>)
–	<28 или – <28 or –	<25 или – <or –	В пробе ДНК чумного микроба не обнаружена Plague microbe DNA is not detected in the sample
При значении Ct по одному или нескольким каналам If the Ct value for one or more channels is			Результат невалидный. Недостаточно материала для проведения идентификации. Необходимо повторить исследование, также с использованием проб после обогащения The result is invalid. There is not enough material to carry out the identification. It is necessary to repeat the study, also using samples after enrichment
>26...<28	>28...<31	>25...<27	



бранными праймерами и зондами на приборах типа RotorGene: этап денатурации – плюс 95 °C – 5 мин; этап первого циклирования (10 циклов) – плюс 95 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 30 с; этап второго циклирования (35 циклов) – плюс 95 °C – 15 с, 56 °C – 30 с, 72 °C – 15 с. Учет уровня флуоресценции определялся при 56 °C (на этапе второго циклирования) по каналам FAM/Green, JOE/Yellow.

Минимальный и максимальный уровни флуоресценции следующие: для канала FAM/Green – 10–20 FI, а для канала JOE/Yellow – 5–10 FI. В качестве значения Threshold выбран уровень флуоресценции 0,05 для обоих каналов. Оптимальными величинами функции «устранение выбросов» явились: для канала FAM/Green – 5 %, для JOE/Yellow – 10 %. Базируясь на проведенных экспериментах, выяснена максимальная величина порогового цикла (Ct): для канала FAM (Green) ПЦР-смеси-вид Ct равен 26; для канала FAM (Green) ПЦР-смесь-подвид – 28, для канала JOE (Yellow) ПЦР-смесь-подвид – 25 (табл. 1, рисунок).

Выяснено, что чувствительность ПЦР-РВ для каждого из использованных участков генома *Y. pestis* при проведении реакции в соответствии с подобранными оптимальными условиями была не менее $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, а специфичность соответственно – 100 %. Для штаммов каждого подвида и биовара *Y. pestis* отмечалась амплификация только специфичных локусов. При проведении ПЦР-РВ на матрице ДНК гетерологичных микроорганизмов положительного сигнала флуоресценции не отмечалось. Приведенные выше факты говорили о возможности разработки генодиагностического препарата на основе описанного подхода. Для этого изготовлены две экспериментальные серии набора реагентов, получившего название «Генпест-подвид/алтай-РГФ». Данный набор состоит из семи компонентов (табл. 2).

В дальнейшем проведено изучение стабильности свойств набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» при транспортировании и хранении. Условия хранения компонентов данного набора реагентов: для ПЦР-смесь-вид, ПЦР-смесь-подвид, ПЦР-смесь-РГФ, растворитель, ТЕ-буфер, ПКО ДНК *Y. pestis* – при температуре 2...8 °C; для Taq ДНК-полимеразы – при температуре от минус 16 до минус 20 °C. В результате установлено, что набор реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» сохраняет свои функциональные свойства в течение заявленного срока годности, составляющего 6 месяцев. Транспортировочные условия: при температуре 2...8 °C – не более 2 суток, при температуре от минус 16 до минус 20 °C – неограниченно.

Клинические испытания двух серий разработанного медицинского изделия «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» осуществлены с использованием 248 проб, содержащих клетки *Y. pestis* в концентрации $1 \cdot 10^3$ м.к./мл (среди которых 38 проб чистых культур, 98 проб клинического материала и 112 проб биоматериала и объектов окружающей среды). В результате испытания получен положительный результат с использованием приборов типа RotorGene в 99,3 % случаев. Кроме того, в рамках этих клинических испытаний использованы 75 проб с гетерологичными микроорганизмами в концентрации $1 \cdot 10^4$ м.к./мл (использованы штаммы *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *E. kobei*, *E. faecal*, *E. cloacae*, *L. pneumophila*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*, *E. aerogenes*, *C. braakii*, *C. youngae*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *S. saprophyticus*, *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, *S. gallinarum*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*). По итогу их анализа получен отрицательный результат в 100 % случаев. При проведении клинических испытаний отмечена полная внутри-, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость результатов.

Таблица 2 / Table 2

Состав набора реагентов «Генпест-подвид/алтай-РГФ»
The composition of the set of reagents "Genpest-subspecies/Altai-RGF"

Реактив Reagent	Описание Description	Объем, мл Volume, ml	Количество пробирок Number of vials
ПЦР-смесь-вид PCR-mixture-species	Смесь праймеров, зонда, дНТФ и азид натрия – прозрачная розоватая жидкость Mix of primers, probe, dNTP and sodium azide – transparent pinkish liquid	0,25	1
ПЦР-смесь-подвид PCR-mixture-subspecies	Смесь праймеров, зондов, дНТФ и азид натрия – прозрачная розоватая жидкость A mixture of primers, probes, dNTP and sodium azide – transparent pinkish liquid	0,25	1
ПЦР-смесь-РГФ PCR-mixture-RGF	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая Трис-НСl, хлорид калия, хлорид магния, Tween-20, азид натрия, глицерин Transparent colorless liquid containing Tris-HCl, potassium chloride, magnesium chloride, Tween-20, sodium azide, glycerin	0,5	2
Растворитель Solvent	Прозрачная жидкость, являющаяся водой, свободной от нуклеаз Clear liquid that is nuclease-free water	1,0	1
Taq ДНК-полимераза Taq DNA polymerase	Бесцветная жидкость – фермент с активностью 5 ед/мкл Colorless liquid – enzyme with an activity of 5 U/μL	0,04	1
ТЕ-буфер TE buffer	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая трис-НСl, Na ₂ -ЭДТА Clear colorless liquid containing Tris-HCl, Na ₂ -EDTA	1,0	2
ПКО ДНК <i>Y. pestis</i> PCS DNA <i>Y. pestis</i>	Препарат ДНК <i>Y. pestis</i> , сухой, в виде следа от высушенной капли на дне пробирки; после растворения – прозрачная бесцветная жидкость DNA preparation of <i>Y. pestis</i> , dry, in the form of a trace of a dried drop at the bottom of the test tube; after dissolution – clear colorless liquid	0,1	3

В результате показана диагностическая эффективность разработанного медицинского изделия «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» по ТУ 21.20.23-054-01898109-2017 на приборах типа RotorGene. Диагностическая чувствительность «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» – не менее 98,6 % при доверительной вероятности 91 %. Диагностическая специфичность «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» – не менее 99 % при доверительной вероятности 91 %. Набор реагентов прошел государственную регистрацию в установленном порядке, получено регистрационное удостоверение от 05.07.2018 № РЗН 2018/7338.

Таким образом, разработано медицинское изделие «Набор реагентов для выявления и дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов (отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида) методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (ГенПест-подвид/алтай-РГФ)», предназначенное для индикации ДНК возбудителя чумы в пробах клинического и биологического материала, объектов окружающей среды с параллельным выяснением его принадлежности к основному и неосновным подвидам, отдельной дифференциацией алтайского биовара центральноазиатского подвида методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. Набор реагентов характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью и может быть использован в учреждениях, имеющих лицензию на деятельность в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных I–II групп патоген-

ности, в стационарных и мобильных лабораториях. Наиболее актуально использование разработанного набора реагентов на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы и сопредельной части Монголии, для которых характерна одновременная циркуляция основного подвида *Y. pestis* и алтайского биовара центральноазиатского подвида.

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

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 191 с.
2. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Z.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.
3. Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Иванова А.В., Поршаков А.М., Ляпин М.Н., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Аязбаев Т.З., Лопатин А.А., Ашибоков У.М., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпидемиологическая и эпизоотическая обстановка по чуме в Российской Федерации и прогноз ее развития на 2020–2025 гг. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; 1:43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-43-50.
4. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Шарова И.Н., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Михайлов Е.П., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Оглодин Е.Г., Куклев В.Е., Одинокоев Г.Н., Щербакова С.А., Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Витязева С.А., Шестопалов М.Ю., Климов В.Т. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 2. Особенности лабораторной диагностики и молекулярно-генетическая характеристика выделенных штаммов. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2014; 4:43–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-43-51.
5. Балахонов С.В., Ярыгина М.Б., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Витязева С.А., Остак А.С., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Косилко С.А., Корзун В.М. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе

Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 2. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика изолированных штаммов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 4:51–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-51-55.

6. Rahalison L., Vololonirina E., Ratsitorahina M., Chanteau S. Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(1):260–3. DOI: 10.1128/JCM.38.1.260-263.2000.

7. Bai Y., Motin V., Ensore R.E., Osikowicz L., Rosales Rizzo M., Hojgaard A., Kosoy M., Eisen R.J. Pentaplex real-time PCR for differential detection of *Yersinia pestis* and *Y. pseudotuberculosis* and application for testing fleas collected during plague epizootics. *MicrobiologyOpen*. 2020; 9(10):e1105. DOI: 10.1002/mbo3.1105.

8. Kane S.R., Shah S.R., Alfaro T.M. Development of a rapid viability polymerase chain reaction method for detection of *Yersinia pestis*. *J. Microbiol. Methods*. 2019; 162:21–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.05.005.

9. Raktov R.S., Rietveld M.H., Out-Luiting J.J., Kruihof-de Julio M., van Zuijlen P.P., van Doorn R., Ghalbzouri A.E. Exon skipping of TGFβRI affects signalling and ECM expression in hypertrophic scar-derived fibroblasts. *Scars Burn. Heal.* 2020; 6:2059513120908857. DOI: 10.1177/2059513120908857.

10. Mölsä M., Hemmälä H., Katz A., Niemimä J., Forbes K.M., Huitu O., Stuart P., Henttonen H., Nikkari S. Monitoring biothreat agents (*Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*) with a portable real-time PCR instrument. *J. Microbiol. Methods*. 2015; 115:89–93. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.05.026.

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

12. Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Германчук В.Г., Девдариани З.Л., Кутырев В.В. Подвиговая дифференциация штаммов *Yersinia pestis* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2017; 2:22–7.

References

1. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia and Siberia]. Moscow: “Medicine”; 2004. 191 p.

2. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Z.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.

3. Popov N.V., Eroshenko G.A., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Ivanova A.V., Porshakov A.M., Lyapin M.N., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Ayazbaev T.Z., Lopatin A.A., Ashibokov U.M., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kutyrev V.V. [Epidemiological and epizootic situation on plague in the Russian Federation and forecast for its development for 2020–2025]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-43-50.

4. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Sharova I.N., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.K., Mikhailov E.P., Eroshenko G.A., Krasnov Y.M., Kukleva L.M., Cherkasov A.V., Oglodin E.G., Kuklev V.E., Odinkov G.N., Shcherbakova S.A., Balakhonov S.V., Afanas'ev

M.V., Vityazeva S.A., Shestopalov M.Yu., Klimov V.T. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai High-Mountain Natural Focus in 2014. Communication 2. Peculiarities of laboratory diagnostics and molecular-genetic characterization of the isolated strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2014; (4):43–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-43-51.

5. Balakhonov S.V., Yarygina M.B., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.K., Vityazeva S.A., Ostyak A.S., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Kosilko S.A., Korzun V.M. [A case of human plague in Kosh-Agach Region of the Republic of Altai in 2015. Communication 2. Microbiological and molecular-genetic characteristics of the isolated strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (4):51–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-51-55.

6. Rahalison L., Vololonirina E., Ratsitorahina M., Chanteau S. Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(1):260–3. DOI: 10.1128/JCM.38.1.260-263.2000.

7. Bai Y., Motin V., Ensore R.E., Osikowicz L., Rosales Rizzo M., Hojgaard A., Kosoy M., Eisen R.J. Pentaplex real-time PCR for differential detection of *Yersinia pestis* and *Y. pseudotuberculosis* and application for testing fleas collected during plague epizootics. *MicrobiologyOpen*. 2020; 9(10):e1105. DOI: 10.1002/mbo3.1105.

8. Kane S.R., Shah S.R., Alfaro T.M. Development of a rapid viability polymerase chain reaction method for detection of *Yersinia pestis*. *J. Microbiol. Methods*. 2019; 162:21–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.05.005.

9. Raktov R.S., Rietveld M.H., Out-Luiting J.J., Kruihof-de Julio M., van Zuijlen P.P., van Doorn R., Ghalbzouri A.E. Exon skipping of TGFβRI affects signalling and ECM expression in hypertrophic scar-derived fibroblasts. *Scars Burn. Heal.* 2020; 6:2059513120908857. DOI: 10.1177/2059513120908857.

10. Mölsä M., Hemmälä H., Katz A., Niemimä J., Forbes K.M., Huitu O., Stuart P., Henttonen H., Nikkari S. Monitoring biothreat agents (*Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*) with a portable real-time PCR instrument. *J. Microbiol. Methods*. 2015; 115:89–93. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.05.026.

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

12. Nikiforov K.A., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Germanchuk V.G., Devdariani Z.L., Kutyrev V.V. [Subspecific differentiation of *Yersinia pestis* strains by PCR with hybridization-fluorescent registration of results]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2017; 2:22–7.

Authors:

Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sitmbetov D.A., Osina N.A., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Никифоров К.А., Куклева Л.М., Ситмбетов Д.А., Осина Н.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-96-104

УДК 616.36-002

Ю.В. Останкова¹, Е.Н. Серикова¹, А.В. Семенов², М.Д. Банцевич³, С.Б. Филипович-Вигньевич³,
Е.Б. Зуева¹, Г.В. Васильева⁴, Я.В. Заря⁴, М.А. Сайтгалина¹, А.Р. Иванова¹, А.С. Жабасова⁵,
Арег А. Тотолян¹

ХАРАКТЕРИСТИКА СВЯЗАННЫХ С HBsAg-НЕГАТИВНОЙ ФОРМОЙ ЗАБОЛЕВАНИЯ МУТАЦИЙ ВИРУСА ГЕПАТИТА В У ПАЦИЕНТОВ ГЕМОДИАЛИЗНЫХ ЦЕНТРОВ

¹ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ²Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Екатеринбург, Российская Федерация; ³Институт вирусологии, вакцин и сывороток «Торлак», Белград, Республика Сербия; ⁴ООО «Центр Диализа Санкт-Петербурга», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ⁵Санкт-Петербургское ГБУЗ «Городская поликлиника № 17», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Цель работы – охарактеризовать мутации в геноме вируса гепатита В (ВГВ), связанные с HBsAg-негативной формой заболевания, у пациентов, получающих заместительную терапию гемодиализом. **Материалы и методы.** Материалом исследования служили образцы плазмы крови пациентов из гемодиализных центров Санкт-Петербурга, Россия (173 образца) и Белграда, Сербия (108 образцов), которые тестировали на наличие серологических и молекулярно-генетических маркеров вируса гепатита В с последующим полногеномным секвенированием и определением значимых мутаций. **Результаты и обсуждение.** Антитела к гепатиту В выявили у 7,5 и 11,1 % пациентов из Санкт-Петербурга и Белграда соответственно, а HBsAg – в 1,1 % случаев в группе из России и в 0,9 % – из Сербии. ДНК ВГВ как у пациентов из Санкт-Петербурга, так и из Белграда обнаружили в 2,8 % исследуемых проб. Филогенетический анализ девяти вирусных изолятов показал, что преобладал вирус генотипа D (88,9 %) по сравнению с генотипом A (11,1 %). Среди образцов, полученных от пациентов из Санкт-Петербурга, четыре относились к субгенотипу D2, а один – генотипу D3. Четыре образца от больных из Белграда относились к субгенотипам D1, D2, D3, A2. При анализе нуклеотидных последовательностей ВГВ во всех случаях выявлены мутации в MHR-регионе и только в HBsAg-негативных изолятах – в области 124–147 аминокислот, в том числе мутации P120T, R122K, A128V, Q129R, M133I, G145R, влияющие на распознавание HBsAg анти-HBs-антителами и связанные с устойчивостью вируса к вакцине. Результаты исследования указывают на сохранение проблемы передачи возбудителей гемоконтактных вирусных гепатитов в отделениях гемодиализа Российской Федерации и Республики Сербия. Распространенность скрытой формы хронического гепатита В и мутаций вакцинного бегства во всех выявленных случаях свидетельствует о необходимости обратить внимание на встречаемость мутантных вариантов возбудителя у пациентов гемодиализных центров.

Ключевые слова: вирус гепатита В, оккультный гепатит В, скрытый гепатит В, серологические маркеры, молекулярно-биологические маркеры, клинически значимые мутации, лабораторная диагностика, гемодиализ.

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

Для цитирования: Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Банцевич М.Д., Филипович-Вигньевич С.Б., Зуева Е.Б., Васильева Г.В., Заря Я.В., Сайтгалина М.А., Иванова А.Р., Жабасова А.С., Тотолян Арег А. Характеристика связанных с HBsAg-негативной формой заболевания мутаций вируса гепатита В у пациентов гемодиализных центров. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:96–104. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-96-104
Поступила 08.11.2021. Принята к публ. 14.12.2021.

Yu.V. Ostankova¹, E.N. Serikova¹, A.V. Semenov², M.D. Bancevic³, S.B. Filipovic-Vignjevic³,
E.B. Zueva¹, G.V. Vasil'eva⁴, Ya.V. Zarya⁴, M.A. Saitgalina¹, A.R. Ivanova¹, A.S. Zhabasova⁵,
Areg A. Totolian¹

Profile of Hepatitis B Virus Mutations Associated with HBsAg-Negative Disease in Patients of Hemodialysis Centers

¹St. Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russian Federation;

²Ekatereburg Research Institute of Viral Infections of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Ekaterinburg, Russian Federation;

³Institute of Virology, Vaccines and Sera "Torlak", Belgrade, Republic of Serbia;

⁴Limited Liability Company "Saint Petersburg Dialysis Center", Saint Petersburg, Russian Federation;

⁵St. Petersburg City Polyclinic No 17, Saint Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to characterize mutations in the hepatitis B virus (HBV) genome associated with HBsAg-negative form of the disease in patients receiving hemodialysis replacement therapy. **Materials and methods.** We used blood plasma samples obtained from hemodialysis centers in St. Petersburg, Russia – 173 patients and 108 patients from Belgrade, Republic of Serbia. The samples were examined for the presence of serological (HBsAg, antibodies anti-HBs IgG, anti-HBcore IgG) and molecular-genetic (HBV DNA) markers of HBV followed by whole-genome sequencing and determination of clinically significant virus mutations. **Results and discussion.** Antibodies to hepatitis B were detected in 7.5 % and 11.1 % of patients from St. Petersburg and Belgrade, respectively. HBsAg was identified only in 1.1 % of cases in the group from Russia and in 0.9 % of cases in the group from Serbia. HBV DNA was determined in 2.8 % of the studied samples from both, patients from Saint-Petersburg and Belgrade. Phylogenetic analysis of 9 viral isolates showed that genotype D virus (88.9 %) prevailed as compared to genotype A (11.1 %) in the examined group. Among the samples obtained from patients from St. Petersburg, four belonged to the D2 sub-genotype, one to the D3

genotype. Four samples obtained from Belgrade patients belonged to different sub-genotypes – D1, D2, D3, A2, respectively. When analyzing the nucleotide sequences of the HBV genomes, mutations in the MHR region were detected in all cases, but only in HBsAg-negative isolates, mutations were revealed in the region of 124–147 amino acids, including mutations P120T, R122K, A128V, Q129R, M133I, G145R affecting the recognition of HBsAg by anti-HBs antibodies and associated with the resistance of the virus to the vaccine. The results of this study indicate that transmission of blood-borne viral hepatitis agent in the hemodialysis departments of the Russian Federation and the Republic of Serbia still exists. The prevalence of the latent chronic hepatitis B, coupled with the presence of vaccine escape mutations in all identified cases, indicates the need to pay close attention to the occurrence of the virus mutant variants in hemodialysis centers.

Key words: hepatitis B virus, occult hepatitis B infection, latent hepatitis B serological markers, molecular-biological markers, clinically significant mutations, laboratory diagnostics, hemodialysis.

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

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

Citation: Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Semenov A.V., Bancevic M.D., Filipovic-Vignjevic S.B., Zueva E.B., Vasil'eva G.V., Zarya Ya.V., Saitgalina M.A., Ivanova A.R., Zhabasova A.S., Totolian Ar.A. Profile of Hepatitis B Virus Mutations Associated with HBsAg-Negative Disease in Patients of Hemodialysis Centers. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:96–104. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-96-104

Received 08.11.2021. Accepted 14.12.2021.

Ostankova Yu.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Serikova E.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>

Semenov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Bancevic M.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2364-9980>

Filipovic-Vignjevic S.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1373-6872>

Zueva E.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Vasil'eva G.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7267-6024>

Zarya Ya.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3451-9674>

Saitgalina M.A., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7603-3269>

Ivanova A.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4794-7475>

Zhabasova A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9887-8246>

Totolian Ar.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Терминальная стадия почечной недостаточности (ТПН) представляет собой серьезную проблему для здравоохранения практически во всех странах. Пациентам с ТПН различной этиологии необходим постоянный гемодиализ, во время которого происходят удаление из организма токсических продуктов обмена веществ и нормализация водного и электролитного балансов, а также могут требоваться переливание крови, госпитализация и хирургическое вмешательство [1]. Такие пациенты подвержены высокому риску развития инфекционных заболеваний. С одной стороны, частые процедуры гемодиализа и введение препаратов крови значительно увеличивают риск вирусных инфекций. С другой стороны, уремия приводит к развитию вторичного иммунодефицита, что связано с более высокой заболеваемостью, тяжелым, затяжным течением болезней и, как следствие, повышением смертности и заболеваемости в этой когорте. Кроме того, инфекционные заболевания у пациентов с уремией имеют более высокие показатели хронизации, в то время как хронические вирусные инфекции представляют собой серьезное препятствие для трансплантации почки, признанной терапевтической цели у пациентов с ТПН, находящихся на гемодиализе [2]. Наиболее частыми вирусными инфекциями, встречающимися в отделениях гемодиализа, являются вирусы гепатита В (ВГВ), гепатита С (ВГС) и – в меньшей степени – инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

Хронический вирусный гепатит В (ХГВ) – патология, от которой страдают около 400 млн человек во всем мире. У большинства диализных пациентов, впервые инфицированных ВГВ, клиническое течение заболевания относительно легкое, часто бессимптомное, с нормальными или лишь незначительно повышенными уровнями трансаминаз в сыворотке крови. В то же время влияние вирусных

гепатитов на трансплантаты почек и исход лечения пациентов остается спорным. Некоторые исследования свидетельствуют, что инфекция не влияла на выживаемость пациентов, другие исследования, напротив, показали более короткую выживаемость у ВГВ-инфицированных реципиентов почечного трансплантата по сравнению с реципиентами без вирусного гепатита. И, в то время как инфекция, вызываемая ВГС, не оказывает значительного влияния на выживаемость пациентов, инфекция, вызываемая ВГВ, отрицательно сказывается на выживаемости пациентов, находящихся на гемодиализе. Причем для ВГВ-инфицированных лиц уровень выживаемости гораздо выше после трансплантации почки, чем на гемодиализной терапии [3].

До появления вакцинации против ВГВ некоторые успехи в ограничении распространения вируса были достигнуты путем диализа серопозитивных пациентов отдельно от серонегативных. Однако эти меры не могли исключить инфицирование от больных HBsAg-негативным или скрытым (окультным) ХГВ (СкГВ), характеризующимся недетектируемым уровнем HBsAg в плазме крови при наличии ДНК ВГВ в ткани печени и крайне низким уровнем вирусной нагрузки в крови вплоть до неопределяемого, независимо от наличия или отсутствия иных серологических маркеров [4]. Дальнейшие превентивные стратегии включали увеличение доступности одно-разовых диализаторов, сложных аппаратов с электронными отказоустойчивыми системами, замену артериовенозных шунтов фистулами, прочные синтетические трансплантаты и постоянные венозные катетеры с манжетами. Хотя внедрение программ вакцинации и строгих мер инфекционного контроля позволило ограничить распространение инфекции гепатита в диализных учреждениях, вспышки болезни продолжают происходить периодически, а пока-

затели распространенности остаются неприемлемо высокими. Во-первых, пациенты с ТПН демонстрируют значительно более низкую эффективность вакцинации против ВГВ по сравнению со здоровыми людьми. В среднем около 60 % больных ТПН достигают достаточных титров антител анти-HBs IgG по сравнению с 95 % здоровых лиц. Точные механизмы, лежащие в основе неудачной вакцинации, не ясны. Помимо прямых иммунотоксических эффектов многочисленных уремических метаболитов, среди причин неудачной вакцинации обсуждаются нехватка факторов роста и гормонов, недостаточная доступность инсулина, приводящая к нарушению клеточного и гуморального иммунитета [5]. Во-вторых, повышенный риск инфицирования может объясняться различными причинами, включая размещение пациентов с гепатитом в отделениях гемодиализа вместе с ВГВ-отрицательными пациентами, находящимися на гемодиализе (краткосрочное или долгосрочное), контакт с загрязненными продуктами крови, совместное использование гемодиализного оборудования, повреждение кожи, предыдущие иммунодефициты и низкий статус вакцинации [6]. В целом все эти факторы приводят к тому, что ВГВ относится к наиболее частым вирусным инфекциям среди людей с почечной недостаточностью [7]. Интересно, что одна из основных причин ХГВ у взрослых пациентов, находящихся на гемодиализе, восходит к скрытой форме заболевания, в том числе из-за подавления иммунной системы. Согласно литературным данным, распространенность ХГВ, включая СкГВ, у диализных пациентов колеблется от 0 до 58 % [8]. Эти расхождения в частоте СкГВ у диализных пациентов могут отражать различную распространенность ВГВ-инфекции в разных странах и разных диализных отделениях. Другие возможные объяснения включают различия чувствительности применяемых диагностических методов, размер и вирусологические особенности обследуемых групп пациентов. Таким образом, инфекция, вызываемая ВГВ, и ее своевременная диагностика остаются важными проблемами при заместительной почечной терапии.

Цель нашей работы – охарактеризовать связанные с HBsAg-негативной формой заболевания мутации в геноме вируса гепатита В у пациентов, получающих заместительную терапию гемодиализом.

Материалы и методы

В работе использованы образцы плазмы крови, полученные из двух гемодиализных центров: 173 пациента из Санкт-Петербурга (Российская Федерация) и 108 пациентов из Белграда (Республика Сербия). От всех участников исследования получено информированное согласие.

Обследование пациентов на наличие серологических маркеров ХГВ методом ИФА заключалось в качественном обнаружении HBsAg, антител анти-HBs IgG, анти-HBcore IgG, а также определя-

ли маркер вирусного гепатита С (ГС) – антитела к ВГС анти-НСV. Анализы проводили с использованием коммерческих наборов «ДС-ИФА-HBsAg», «ДС-ИФА-АНТИ-HBsAg», «ДС-ИФА-АНТИ-HBc», «ДС-ИФА-АНТИ-НСV» (НПО «Диагностические системы», Россия) и «Вектогеп В-HBs-антиген», «ВектоHBsAg-антитела», «Гепабест анти-HBc-IgG», (АО «Вектор-Бест», Российская Федерация) согласно инструкциям производителя.

Обследование на наличие молекулярно-биологических маркеров методом ПЦР осуществляли с предварительным выделением ДНК/РНК с использованием коммерческого набора «АмплиПрайм Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Российская Федерация). Определение ДНК ВГВ проводили методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с помощью коммерческого набора «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Российская Федерация) согласно инструкции производителя. Дальнейшее определение ДНК ВГВ проводили с использованием разработанной в ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» методики, позволяющей выявлять ДНК ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке, в том числе при СкГВ [9]. Для всех выявленных образцов проводили секвенирование и последующий анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов ВГВ как описано ранее [10].

Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета программ MS Excel, Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). При оценке статистической погрешности использовали «точный» интервал Клоппера – Пирсона. Результаты представлены с указанием 95 % доверительного интервала (95 % ДИ). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. В качестве порога достоверности отличий определено значение вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Обследованные группы были сходны по составу: так, в группе пациентов из Санкт-Петербурга возраст обследованных лиц варьировал от 20 до 83 лет и составил в среднем $(56,8 \pm 15,4)$ года, а в группе из Белграда при диапазоне возраста пациентов от 25 до 82 лет средний возраст составил $(56,6 \pm 13,2)$ года. Количество женщин в группе из Санкт-Петербурга незначительно преобладало по сравнению с мужчинами: 54,9 и 45,1 % соответственно, в группе из Белграда представлено практически равное соотношение женщин и мужчин – 49,1 и 50,9 % соответственно.

При оценке общей распространенности серологических маркеров вирусных гепатитов было пока-

зано, что антитела к ГС выявляли у 7,5 % (95 % ДИ: 4,06–12,51) и 11,1 % (95 % ДИ: 5,87–18,6) пациентов из Санкт-Петербурга и Белграда соответственно. Маркеры ХГВ в анализируемых группах выявлены в 92,5 % (95 % ДИ: 87,49–95,94) и 87,1 % (95 % ДИ: 79,21–92,73) случаев. Впрочем, большая часть этих случаев связана с поствакцинальными антителами к ВГВ анти-HBs IgG. Кроме того, в группе пациентов из России выявлено 24,3 % (95 % ДИ: 18,09–31,37) случаев анти-HBscore IgG, 90,5 % из них (21,9 % от группы) – с анти-HBs IgG, а в группе из Сербии – 25,9 % (95 % ДИ: 17,97–35,25) случаев анти-HBscore IgG, 78,6 % из них (20,4 % от группы) – с анти-HBs IgG. Эти результаты указывают на то, что 21,9 и 20,4 % пациентов соответственно контактировали с вирусом, выздоровели и сохранили определяемые уровни нейтрализующих антител после естественного заражения. При этом HBsAg выявлен только в 1,1 % (95 % ДИ: 0,14–4,11) случаев в группе из Российской Федерации и в 0,9 % (95 % ДИ: 0,02–5,05) – из Республики Сербия. Результат анализа распределения исследованных маркеров вирусных гепатитов В и С в группах представлен в табл. 1.

При молекулярно-генетическом анализе ДНК ВГВ в группе пациентов из Санкт-Петербурга выявили у HBsAg-позитивных лиц (1,1 % пациентов), а также у трех HBsAg-негативных пациентов (1,7 %), то есть у 2,8 % (95 % ДИ: 0,92–6,43) лиц. В группе белградских пациентов ДНК ВГВ также выявили у HBsAg-позитивного больного (0,9 % пациентов), а также у трех HBsAg-негативных лиц (2,8 %), то есть у 3,7 % (95 % ДИ: 1,02–9,21) пациентов. Во всех выявленных нами случаях СкГВ вирусная нагрузка ВГВ составила менее 50 МЕ/мл.

Интересно, что мы не выявили достоверных различий в распространенности серологических и молекулярно-биологических маркеров ХГВ у пациентов гемодиализных центров Санкт-Петербурга и Белграда. Не показано корреляции с возрастом, полом, продолжительностью диализа, вакцинацией против ВГВ и историей переливания крови пациентов. Можно предположить, что сходный результат будет получен при анализе распространенности соответствующих маркеров в других гемодиализных

центрах указанных регионов.

В Сербии наблюдается промежуточный характер инфицирования ВГВ с распространенностью HBsAg около 2–7 % от общей численности населения и смешанными моделями передачи инфекции у младенцев, детей раннего возраста и взрослых, среди субгенотипов ВГВ представлены D3, D2, D1, D4 и A2 [11]. Согласно регистру пациентов, получающих заместительную почечную терапию в Сербии и Черногории в 2002 г., 31,8 % диализных пациентов и 9,6 % пациентов, перенесших трансплантацию почки, были анти-ВГС-положительными, в то время как 15,2 % диализных и 10,6 % пациентов, перенесших трансплантацию почки, имели положительный результат по HBsAg [3]. Полученные нами результаты свидетельствуют о значительном улучшении ситуации в настоящее время.

Ранее в Российской Федерации было показано, что среди пациентов гемодиализных центров в Москве распространенность маркеров вирусного гепатита В в период 1996–2001 гг. составляла до 61 %, а встречаемость HBsAg – до 12 %. Примерно в это же время в разных отделениях гемодиализа в Санкт-Петербурге распространенность HBsAg составляла от 0 до 12,9 %, в то время как доля анти-HBc IgG варьировала от 38,6 до 52,7 %, а доля анти-HBs IgG – от 12,8 до 36,6 % [12]. Таким образом, полученные нами результаты отличаются только в значительно большей представленности в обследованных нами группах антител анти-HBs IgG, что, по всей видимости, связано с активной вакцинацией против гепатита В.

Полученные нами результаты в целом сходны с результатами других исследовательских групп при оценке распространенности парентеральных вирусных гепатитов у пациентов, получающих гемодиализную терапию. Так, в 2010 г. в исследовании, проведенном А. Aghakhani *et al.*, распространенность скрытого ХГВ у гемодиализных пациентов в Иране определяли посредством выявления изолированных анти-HBc IgG, а затем у позитивных по маркеру пациентов выявляли ДНК ВГВ, в результате у 6,2 % пациентов выявлены изолированные анти-HBc IgG, а ДНК вируса обнаружена у 3,1 % пациентов, причем

Таблица 1 / Table 1

Распределение серологических маркеров ГВ (HBsAg, анти-HBscore IgG, анти-HBs IgG) и ГС (анти-HCV) в обследованных группах
HB and HC serological markers (HBsAg, anti-HBscore IgG, anti-HBs IgG, anti-HCV) distribution in the examined groups

Выявленные серологические маркеры в сыворотке крови Serological markers detected in blood serum	Обследованная группа из Санкт-Петербурга (n=173), доля от общего числа обследованных, % The surveyed group from St. Petersburg (n=173), proportion out of the total surveyed number, %	Обследованная группа из Белграда (n=108), доля от общего числа обследованных, % The surveyed group from Belgrade (n=108), proportion out of the total surveyed number, %	Достоверность различия между группами Significance of differences between groups
HBsAg+	1,10	0,90	p>0,05
HBs IgG+	67,10	60,20	p>0,05
HBscore IgG+	24,30	25,90	p>0,05
HBscore IgG+, HBs IgG+	21,90	20,40	p>0,05
HCV IgG+	7,50	11,10	p>0,05

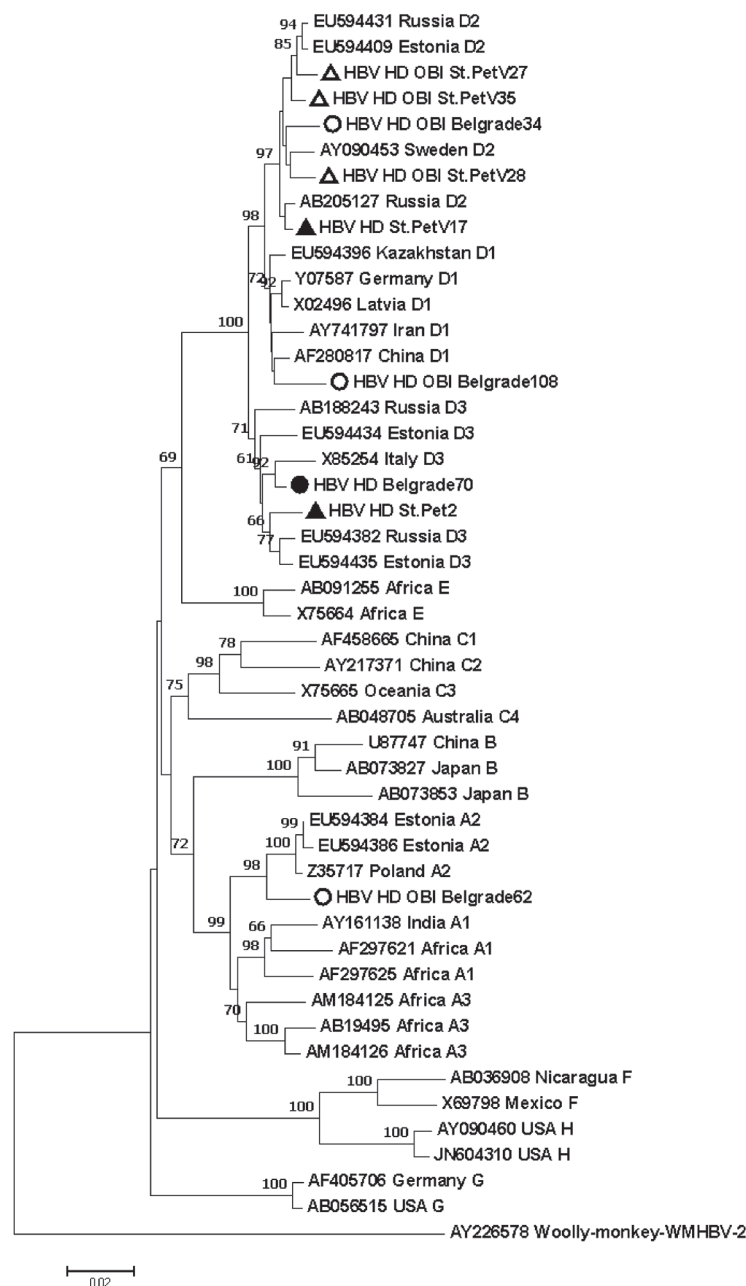
вирусная нагрузка во всех выявленных случаях была менее 50 МЕ/мл [13]. Спустя пять лет при обследовании HBsAg-негативных гемодиализных пациентов в г. Зенджан (Иран) 23,5 % пациентов были анти-HBscore IgG-положительными, 66,3 % – положительными по анти-HBs IgG, а ДНК ВГВ обнаружена у 2,1 % лиц, вакцинированных против гепатита В [14]. Исследователи в Египте сообщали, что распространенность СкГВ среди гемодиализных пациентов составляла от 1,5 до 4,1 % случаев, в Турции – 2,7 % [2]. Однако в других исследованиях сообщается о значительно большей представленности HBsAg-негативного ХГВ среди гемодиализных пациентов. Например, в Палестине распространенность СкГВ у таких больных составляет 12,5 %, в Бразилии ДНК ВГВ обнаружена в 15 % проб, полученных от HBsAg-отрицательных пациентов, в Турции при исследовании распространенности СкГВ у пациентов с непрерывным амбулаторным перитонеальным диализом и пациентов с гемодиализом ДНК ВГВ выявляли у 9,8 и 16,9 % пациентов соответственно [2]. По всей видимости, такие отличия в результатах могут быть связаны как с различным уровнем распространенности ХГВ в разных странах и регионах, так и с разной чувствительностью и специфичностью используемых для выявления ДНК ВГВ методов.

Ранее сообщалось, что СкГВ – обычное явление у гемодиализных пациентов с изолированными антителами анти-HBscore IgG, однако из шести выявленных нами HBsAg-негативных случаев четыре представлены серонегативным СкГВ. Принято считать, что в целом до 20 % лиц с СкГВ серонегативны, в то время как 80 % – серопозитивны, однако исследования, посвященные выявлению HBsAg-негативной формы ХГВ у гемодиализных пациентов, демонстрируют иную картину, когда почти половина обнаруженных СкГВ были серонегативными по анти-HBscore IgG и анти-HBs IgG антителам [15], вплоть до случаев, где только 20 % СкГВ серопозитивны [14]. Как уже было упомянуто выше, у пациентов с хронической почечной недостаточностью клеточные и гуморальные иммунные ответы проявляют специфические и неспецифические дефекты, в результате чего анти-HBs-ответ гемодиализных пациентов на вакцинацию низок и оценивается в 45–60 % [16]. По всей видимости, с этими же причинами может быть связано преобладание серонегативного СкГВ среди гемодиализных пациентов в исследованиях разных научных групп, включая нашу. В то же время известно, что показатели сывороточных трансаминаз имеют тенденцию к снижению у диализных пациентов, что затрудняет определение повреждения печени с помощью биохимических тестов, причем при анализе ферментов печени не показано каких-либо значимых отличий у пациентов с СкГВ по сравнению с ВГВ-отрицательными пациентами [17]. Таким образом, в связи с нормальными биохимическими показателями и отсутствием у большинства больных определяемых антигенов ВГВ и/или соответствующих антител, выявление

СкГВ молекулярными методами с высокой чувствительностью остается фактически единственным способом лабораторной диагностики инфицированных пациентов.

Нуклеотидные последовательности полных геномов выявленных изолятов ВГВ депонированы в международную базу данных GenBank под номерами OK998519–OK998527. При филогенетическом анализе девяти изолятов ВГВ показано, что в обследованной группе преобладал вирус генотипа D (88,9 %) по сравнению с генотипом А (11,1 %). Среди образцов, полученных от пациентов из Санкт-Петербурга, четыре относились к субгенотипу D2, один – к генотипу D3. Четыре образца, полученные от больных из Белграда, относились к разным субгенотипам: D1, D2, D3, A2 соответственно (рисунок). Выявленные геноварианты ВГВ характерны для Российской Федерации и Республики Сербия.

HBsAg, основной белок оболочки ВГВ, состоит из 226 аминокислотных остатков (а.о.) и кодируется геном S, который включает N-конец (положения аминокислот 1–99), главную гидрофильную область (MHR) (положения аминокислот 100–169) и С-конец (положения аминокислот 170–226). MHR-регион обладает высокой иммуногенностью, находится под избирательным давлением иммунной системы хозяина и содержит детерминанту «А», представляющую собой кластер основных эпитопов В-клеток, расположенных между 124 и 147 (или 149) а.о. Этот фрагмент состоит из двух петель, связанных дисульфидными мостиками между cys124 – cys137 и cys139 – cys147, и считается основной иммунной мишенью для индуцированных пассивной или активной иммунизацией антител, используемой в диагностических анализах [8]. Возникающие в результате отбора или естественной изменчивости мутации в регионе, кодирующем выработку HBsAg, особенно в детерминанте «А», могут влиять на антигенность этого белка за счет конформационных изменений, приводящих к неспособности нейтрализации вируса анти-HBs-антителами. К настоящему времени в этом регионе генома вируса идентифицировано более 30 мутаций иммунного ускользания, которые могут быть ассоциированы с препятствием связывания HBsAg с антителами, используемыми в диагностических тест-системах для обнаружения и количественного определения HBsAg, а также могут препятствовать распознаванию HBsAg антителами, индуцированными вакциной, что создает потенциальную угрозу для глобальной программы вакцинации. Эти мутации могут представлять опасность для общественного здравоохранения в связи с их патогенетическим потенциалом и возможностью передачи вируса вакцинированным лицам. Вакцинация против ВГВ, по-видимому, сопровождается появлением и/или отбором мутантов ВГВ, ускользающих от иммунитета, которые обеспечивают устойчивость вируса, несмотря на достаточно высокие титры нейтрализующих антител. Кроме того, циркуляция



иммуно-ассоциированных мутаций ускользания может представлять проблему с точки зрения повышенного риска реактивации ВГВ у пациентов с ослабленным иммунитетом, что имеет особое значение в случае пациентов с ТПН из-за нарушений клеточного и гуморального иммунитета [18]. Понимание распространенности и разнообразия мутаций в S-гене очень важно, так как реактивация ВГВ коррелирует с мутациями HBsAg, наделенными повышенной способностью уклоняться от иммунного ответа. Это подчеркивает необходимость тщательного наблюдения за пациентами с мутациями ВГВ на предмет риска реактивации и быстрой терапии для предотвращения клинических осложнений, связанных с ХГВ.

Информация о клинически значимых мутациях, выявленных у ВГВ-инфицированных пациентов гемодиализных центров в нашем исследовании, представлена в табл. 2.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов ВГВ, выделенных от пациентов гемодиализных центров, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями:

Референсные последовательности обозначены кодами GenBank с указанием генотипа и региона происхождения образца. Как внешняя группа использована нуклеотидная последовательность ВГВ шерстистой обезьяны AY226578. Исследованные в настоящей работе образцы обозначены следующим образом: черные треугольники – HBsAg(+) изоляты из России; белые треугольники – HBsAg(-) изоляты из России; черные кружки – HBsAg(+) изоляты из Сербии; белые кружки – HBsAg(-) изоляты из Сербии. Даны значения bootstrap ≥ 60

Phylogenetic analysis of complete HBV genome nucleotide sequences, isolated from patients of hemodialysis centers in comparison with the reference sequences presented in the GenBank international database:

Reference sequences are designated with GenBank codes indicating the genotype and region of the sample origin. The Woolly Monkey HBV nucleotide sequence, AY226578, was used as the outer group. The samples studied in this work are designated as follows: black triangles – HBsAg(+) isolates from Russia; white triangles – HBsAg(-) isolates from Russia; black circles – HBsAg(+) isolates from Serbia; white circles – HBsAg(-) isolates from Serbia. Bootstrap values ≥ 60

При анализе нуклеотидных последовательностей геномов ВГВ во всех случаях выявлены мутации в MHR-регионе, но только в HBsAg-негативных изолятах выявлены мутации в области 124–147 аминокислот. Мутации P120T, R122K, A128V, Q129R, M133I, G145R известны как влияющие на распознавание HBsAg анти-HBs-антителами, в то же время аминокислотные замены P120T, Q129R, M133I, G145R связаны с устойчивостью вируса к вакцине [18]. Отметим, что для выявленной нами в изоляте HBV_HD_OBI_Belgrade62 мутации I150V MHR-региона не доказана эскапе-значимость, однако ранее эта мутация была определена в исследованиях, посвященных биохимической характеристике естественных мутаций в пределах MHR и их клиническому значению у тунисских пациентов [19]. Любопытно, что мутация K160R, выявленная нами в изоляте HBV_HD_OBI_Belgrade108 субгенотипа D1, ранее

Таблица 2 / Table 2

Клинически значимые мутации, выявленные в исследуемой группе
The clinically significant mutations identified in the examined group

Изолят Isolate	Страна, HBsAg+/- Country, HBsAg+/-	Генотип Genotype	Мутации в регионе MHR MHR region mutations	Другие мутации Other mutations
HBV_HD_St.Pet2	Россия, HBsAg+ Russia, HBsAg+	D3	Y100N, T127P	Core-L116I
HBV_HD_St.PetV17	Россия, HBsAg+ Russia, HBsAg+	D2	T118V	Core-L116I
HBV_HD_OBI_St.PetV35	Россия, HBsAg- Russia, HBsAg-	D2	T118V, T127I, A128V	Core-L116I
HBV_HD_OBI_St.PetV28	Россия, HBsAg- Russia, HBsAg-	D2	T118V, R122K, A128V, T131A	Core-L116I, T142I
HBV_HD_OBI_St.PetV27	Россия, HBsAg- Russia, HBsAg-	D2	T118V, A128V	Core-L116I, P130Q
HBV_HD_Belgrade70	Сербия, HBsAg+ Serbia, HBsAg+	D3	T127P	Core-L116I, L143I
HBV_HD_OBI_Belgrade108	Сербия, HBsAg- Serbia, HBsAg-	D1	L109P, T118M, P120T, T123G, T127P, Q129P, G145R, K160R	Core-T147C
HBV_HD_OBI_Belgrade62	Сербия, HBsAg- Serbia, HBsAg-	A2	C124S, Q129R, T143A, I150V	PreCore-S11F
HBV_HD_OBI_Belgrade34	Сербия, HBsAg- Serbia, HBsAg-	D2	T118V, T127P, A128V, M133I	PreCore-L3F Core-L116I

описана как нехарактерная для ВГВ генотипа D, с предположением, что некоторые мутации, связанные с СкГВ, уникальны для того или иного генотипа ВГВ, в частности указанную мутацию рассматривали как ассоциированную с HBsAg-негативной формой ХГВ при генотипе А [20].

Согласно международным данным, распространенность ассоциированных с СкГВ мутаций колеблется от 8,3 до 20,8 % у пациентов с HBsAg-негативным ХГВ, тогда как у пациентов с HBsAg-позитивной формой заболевания она составляет 0–3,7 %. Однако сравнение частоты мутаций между различными исследованиями затруднено из-за ряда различий в том, что считается СкГВ-ассоциированной мутацией, и в том, включают ли эти мутации аминокислотные замены только в детерминанте «А» или в полной MHR-области [21]. Известно, что ВГВ генотипа D характеризуется набором специфических иммуно-ассоциированных ускользающих мутаций, например, замены A128V и P120S чаще встречаются среди изолятов данного типа, чем среди представителей генотипа А. В то же время для вируса генотипа D показана большая склонность к развитию HBeAg-отрицательного хронического гепатита за счет обширного накопления мутаций в PreCore/Core промоторе вирусного генома в ответ на давление иммунитета хозяина. Возможно, это давление может также способствовать возникновению и отбору иммуно-ассоциированных мутаций ускользания в регионе HBsAg [18]. В семи изолятах в Core-регионе показана мутация L116I, в трех из них дополнительно выявлена одна из следующих мутаций: P130Q, T142I, L143I. Аминокислотные замены в позициях 113–143 в эпитопе В-клеток Core-региона влияют на

антигенность и стабильность частицы, могут приводить к ускользанию от иммунитета, а также к хронической персистенции вируса, прогрессированию заболевания, развитию цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Еще для двух аминокислотных замен, выявленных у пациентов: мутации в эпитопе цитотоксических Т-лимфоцитов Core-T147C и мутации S11F в PreCore-регионе, – известна независимая ассоциация с прогрессированием заболевания до цирроза печени и ГЦК.

Для пациентов на гемодиализной терапии идентификация СкГВ жизненно важна, клинические рекомендации должны предусматривать выделение отдельных кабинетов для лечения ВГВ-инфицированных лиц, а также специальных аппаратов, инструментов и расходных материалов. Невозможность обнаружить СкГВ с помощью стандартного скрининга на HBsAg и отсутствие клинических симптомов, свидетельствующих о воспалении печени, могут приводить к длительному риску воздействия на медицинских работников и других пациентов, находящихся на гемодиализе. Ситуация приобретает особую важность, если больные инфицированы вариантами вируса, несущими клинически значимые мутации в регионе MHR. Такие пациенты являются потенциальной проблемой для здравоохранения в целом и для гемодиализных центров в частности, так как могут стать источником способных ускользнуть от вакцин-индуцированных антител патогенов для общей популяции, включая вакцинированных против ВГВ лиц.

Таким образом, результаты настоящего исследования указывают на сохранение проблемы передачи возбудителей гемоконтактных вирусных гепатитов

в отделениях гемодиализа Российской Федерации и Республики Сербия. Распространенность скрытой формы хронического гепатита В относительно высока среди пациентов, что вместе с представленностью мутаций вакцинного бегства во всех выявленных случаях свидетельствует о необходимости обратить пристальное внимание на встречаемость мутантных вариантов вируса в гемодиализных центрах. Полученные данные подтверждают значимость применения высокочувствительных молекулярно-генетических методов для выявления инфицированных лиц, а также важность детальной характеристики циркулирующих в отделениях гемодиализа изолятов вируса гепатита В и молекулярно-эпидемиологических сопоставлений для заключений о путях их передачи.

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

Список литературы

1. Строков А.Г., Гуревич К.Я., Ильин А.П., Денисов А.Ю., Земченков А.Ю., Андрусев А.М., Шутов Е.В., Котенко О.Н., Злоказов В.Б. Лечение пациентов с хронической болезнью почек 5 стадии (ХБП 5) методами гемодиализа и гемодиализации. Клинические рекомендации. *Нефрология*. 2017; 21(3):92–111. DOI: 10.24884/1561-6274-2017-3-92-111.
2. Berniëh B. Viral hepatitis in hemodialysis: An update. *J. Transl. Int. Med.* 2015; 3(3):93–105. DOI: 10.1515/jtmi-2015-0018.
3. Lezaic V., Stosovic M., Marinkovic J., Rangelov V., Djukanovic L. Hepatitis B and hepatitis C virus infection and outcome of hemodialysis and kidney transplant patients. *Ren. Fail.* 2008; 30(1):81–7. DOI: 10.1080/08860220701742211.
4. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F., Lok A.S.; Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2019; 71(2):397–408. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.03.034.
5. Awad G., Roch T., Stervbo U., Kaliszczyk S., Stittrich A., Hörstrup J., Cinkilic O., Appel H., Natrus L., Gayova L., Seibert F., Bauer F., Westhoff T., Nienen M., Babel N. Robust hepatitis B vaccine-reactive T cell responses in failed humoral immunity. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2021; 21:288–98. DOI: 10.1016/j.omtm.2021.03.012.
6. Edey M., Barraclough K., Johnson D.W. Review article: Hepatitis B and dialysis. *Nephrology (Carlton)*. 2010; 15(2):137–45. DOI: 10.1111/j.1440-1797.2009.01268.x.
7. Adane T., Getawa S. The prevalence and associated factors of hepatitis B and C virus in hemodialysis patients in Africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021. 16(6):e0251570. DOI: 10.1371/journal.pone.0251570.
8. Tang Y., Liu X., Lu X., He Q., Li G., Zou Y. Occult Hepatitis B Virus Infection in Maintenance Hemodialysis Patients: Prevalence and Mutations in “a” Determinant. *Int. J. Med. Sci.* 2020; 17(15):2299–305. DOI: 10.7150/ijms.49540.
9. Серикова Е.Н., Семенов А. В., Останкова Ю.В., Тотолян Арег А. Метод выявления вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке с использованием ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(1):59–64. DOI: 10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64.
10. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Totolian Areg A. The First Cases of Hepatitis B Virus Subgenotype D4 Detection in Patients with Chronic, Acute, and Occult Hepatitis B in the Russian Federation. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2020; 35(4):221–8. DOI: 10.3103/S0891416820040072.
11. Lazarevic I., Cupic M., Delic D., Svrtlih N.S., Simonovic J., Jovanovic T. Distribution of HBV genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes among chronically infected patients in Serbia. *Arch. Virol.* 2007; 152(11):2017–25. DOI: 10.1007/s00705-007-1031-0.
12. Мукомолов С.Л., Левакова И.А., Синайская Е.В., Сулягина Л.Г., Кислый П.Н., Тимаховская Г.Ю., Иванова Н.В., Старосельский К.Г., Ряснянский В.Ю. Эпидемиологическая характеристика вирусных гепатитов В и С в отделениях гемодиализа в Санкт-Петербурге в современный период. Часть I. Регистрация гемоконтактных вирусных гепатитов и серологические маркеры вирусных гепатитов В и С у пациентов отделений

- гемодиализа. *Инфекция и иммунитет*. 2011; 1(2):143–50. DOI: 10.15789/2220-7619-2011-2-143-150.
13. Aghakhani A., Banifazl M., Kalantar E., Eslamifar A., Ahmadi F., Razeghi E., Atabak S., Amini M., Khadem-Sadegh A., Ramezani A. Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients with isolated hepatitis B core antibody: a multicenter study. *Ther. Apher. Dial.* 2010; 14(3):349–53. DOI: 10.1111/j.1744-9987.2009.00798.x.
14. Samadi E., Mirshahabi H., Motamed N., Sadeghi H. Prevalence of Occult Hepatitis B Virus Infection in Hemodialysis Patients Using Nested PCR. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 2020; 9(1):82–8. DOI: 10.29252/rbmb.9.1.82.
15. Hashemi S.J., Hajiani E., Masjedizadeh A.R., Makvandi M., Shahbazian H., Shayesteh A.A., Karimi M. A case-control study on occult hepatitis B infection in chronic hemodialysis patients from South-West of Iran. *Govaresh*. 2015; 20(2):135–40.
16. Zerbini A., Pilli M., Boni C., Fiscaro P., Penna A., Di Vincenzo P., Giuberti T., Orlandini A., Raffa G., Pollicino T., Raimondo G., Ferrari C., Missale G. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. 2008; 134(5):1470–81. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.02.017.
17. Minuk G.Y., Sun D.F., Greenberg R., Zhang M., Hawkins K., Uhanova J., Gutkin A., Bernstein K., Giulivi A., Osiowy C. Occult hepatitis B virus infection in a North American adult hemodialysis patient population. *Hepatology*. 2004; 40(5):1072–7. DOI: 10.1002/hep.20435.
18. Colagrossi L., Hermans L.E., Salpini R., Di Carlo D., Pas S.D., Alvarez M., Ben-Ari Z., Boland G., Bruzzone B., Coppola N., Seguin-Devaux C., Dyda T., Garcia F., Kaiser R., Köse S., Krarup H., Lazarevic I., Lunar M.M., Maylin S., Micheli V., Mor O., Paraschiv S., Paraskevis D., Poljak M., Puchhammer-Stöckl E., Simon F., Stanojevic M., Stene-Johansen K., Tihic N., Trimoulet P., Verheyen J., Vince A., Lepej S.Z., Weis N., Yalcinkaya T., Boucher C.A.B., Wensing A.M.J., Perno C.F., Svicher V.; HEPVIR working group of the European Society for translational antiviral research (ESAR). Immune-escape mutations and stop-codons in HBsAg develop in a large proportion of patients with chronic HBV infection exposed to anti-HBV drugs in Europe. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1):251. DOI: 10.1186/s12879-018-3161-2.
19. Chaouch H., Taffon S., Villano U., Equestre M., Bruni R., Belhadj M., Hannachi N., Aouni M., Letaief A., Ciccaglione A.R. Naturally occurring surface antigen variants of hepatitis B virus in Tunisian patients. *Intervirology*. 2016; 59(1):36–47. DOI: 10.1159/000445894.
20. Almeida R.W., Mello F.C.D.A., Menegoy I.V., Santo M.P.D.E., Genuino C.F., Sousa P.S.F., Villar L.M., Lampe E., Lewis-Ximenez L.L. Detection and molecular characterisation of a diagnostic escape variant associated with occult hepatitis B virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2017; 112(7):485–91. DOI: 10.1590/0074-02760160477.
21. Lazarevic I. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: recent advances. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(24):7653–64. DOI: 10.3748/wjg.v20.i24.7653.

References

1. Strokov G.A., Gurevich K.Ya., Il'in A.P., Denisov A.Yu., Zemchenkov A.Yu., Andrushev A.M., Shutov E.V., Kotenko O.N., Zloказov V.B. [Treatment of patients with chronic kidney disease stage 5 (CKD 5) by hemodialysis and hemodiafiltration. Clinical guidelines]. *Neftrologiya [Nephrology]*. 2017. 21(3):92–111. DOI: 10.24884/1561-6274-2017-3-92-111.
2. Berniëh B. Viral hepatitis in hemodialysis: An update. *J. Transl. Int. Med.* 2015; 3(3):93–105. DOI: 10.1515/jtmi-2015-0018.
3. Lezaic V., Stosovic M., Marinkovic J., Rangelov V., Djukanovic L. Hepatitis B and hepatitis C virus infection and outcome of hemodialysis and kidney transplant patients. *Ren. Fail.* 2008; 30(1):81–7. DOI: 10.1080/08860220701742211.
4. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F., Lok A.S.; Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2019; 71(2):397–408. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.03.034.
5. Awad G., Roch T., Stervbo U., Kaliszczyk S., Stittrich A., Hörstrup J., Cinkilic O., Appel H., Natrus L., Gayova L., Seibert F., Bauer F., Westhoff T., Nienen M., Babel N. Robust hepatitis B vaccine-reactive T cell responses in failed humoral immunity. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2021; 21:288–98. DOI: 10.1016/j.omtm.2021.03.012.
6. Edey M., Barraclough K., Johnson D.W. Review article: Hepatitis B and dialysis. *Nephrology (Carlton)*. 2010; 15(2):137–45. DOI: 10.1111/j.1440-1797.2009.01268.x.
7. Adane T., Getawa S. The prevalence and associated factors of hepatitis B and C virus in hemodialysis patients in Africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021. 16(6):e0251570. DOI: 10.1371/journal.pone.0251570.

8. Tang Y., Liu X., Lu X., He Q., Li G., Zou Y. Occult Hepatitis B Virus Infection in Maintenance Hemodialysis Patients: Prevalence and Mutations in "a" Determinant. *Int. J. Med. Sci.* 2020; 17(15):2299–305. DOI: 10.7150/ijms.49540.
9. Serikova E.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Totolian Areg A. [Method for detecting hepatitis B virus in blood plasma at low viral load using real-time PCR]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2021. 66(1):59–64. DOI: 10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64.
10. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Totolian Areg A. The First Cases of Hepatitis B Virus Subgenotype D4 Detection in Patients with Chronic, Acute, and Occult Hepatitis B in the Russian Federation. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2020; 35(4):221–8. DOI: 10.3103/S0891416820040072.
11. Lazarevic I., Cupic M., Delic D., Svrtlih N.S., Simonovic J., Jovanovic T. Distribution of HBV genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes among chronically infected patients in Serbia. *Arch. Virol.* 2007; 152(11):2017–25. DOI: 10.1007/s00705-007-1031-0.
12. Mukomolov S.L., Levakova I.A., Sinaiskaya E.V., Sulyagina L.G., Kisly P.N., Timakhovskaya G.Yu., Ivanova N.V., Staroselsky K.G., Rysanyansky V.Yu. [Epidemiological characteristic of viral hepatitis B and C in the hemodialysis units in Saint-Petersburg in modern time. Part 1. Registration of hemo-contact viral hepatitis and serological markers of HBV and HCV infections in patients of hemodialysis unit]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2011; 1(2):143–50. DOI: 10.15789/2220-7619-2011-2-143-150.
13. Aghakhani A., Banifazl M., Kalantar E., Eslamifar A., Ahmadi F., Razeghi E., Atabak S., Amini M., Khadem-Sadeh A., Ramezani A. Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients with isolated hepatitis B core antibody: a multicenter study. *Ther. Apher. Dial.* 2010; 14(3):349–53. DOI: 10.1111/j.1744-9987.2009.00798.x.
14. Samadi E., Mirshahabi H., Motamed N., Sadeghi H. Prevalence of Occult Hepatitis B Virus Infection in Hemodialysis Patients Using Nested PCR. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 2020; 9(1):82–8. DOI: 10.29252/rbmb.9.1.82.
15. Hashemi S.J., Hajiani E., Masjedizadeh A.R., Makvandi M., Shahbazian H., Shayesteh A.A., Karimi M. A case-control study on occult hepatitis B infection in chronic hemodialysis patients from South-West of Iran. *Govaresh.* 2015; 20(2):135–40.
16. Zerbin A., Pilli M., Boni C., Fiscaro P., Penna A., Di Vincenzo P., Giuberti T., Orlandini A., Raffa G., Pollicino T., Raimondo G., Ferrari C., Missale G. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology.* 2008; 134(5):1470–81. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.02.017.
17. Minuk G.Y., Sun D.F., Greenberg R., Zhang M., Hawkins K., Uhanova J., Gutkin A., Bernstein K., Giulivi A., Osiowy C. Occult hepatitis B virus infection in a North American adult hemodialysis patient population. *Hepatology.* 2004; 40(5):1072–7. DOI: 10.1002/hep.20435.
18. Colagrossi L., Hermans L.E., Salpini R., Di Carlo D., Pas S.D., Alvarez M., Ben-Ari Z., Boland G., Bruzzone B., Coppola N., Seguin-Devaux C., Dyda T., Garcia F., Kaiser R., Köse S., Krarup H., Lazarevic I., Lunar M.M., Maylin S., Micheli V., Mor O., Paraschiv S., Paraskevis D., Poljak M., Puchhammer-Stöckl E., Simon F., Stanojevic M., Stene-Johansen K., Tihic N., Trimoulet P., Verheyen J., Vince A., Lepej S.Z., Weis N., Yalcinkaya T., Boucher C.A.B., Wensing A.M.J., Perno C.F., Svicher V.; HEPVIR working group of the European Society for translational antiviral research (ESAR). Immune-escape mutations and stop-codons in HBsAg develop in a large proportion of patients with chronic HBV infection exposed to anti-HBV drugs in Europe. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1):251. DOI: 10.1186/s12879-018-3161-2.
19. Chaouch H., Taffon S., Villano U., Equestre M., Bruni R., Belhadj M., Hannachi N., Aouni M., Letaief A., Ciccaglione A.R. Naturally occurring surface antigen variants of hepatitis B virus in Tunisian patients. *Intervirology.* 2016; 59(1):36–47. DOI: 10.1159/000445894.
20. Almeida R.W., Mello F.C.D.A., Menegoy I.V., Santo M.P.D.E., Genuino C.F., Sousa P.S.F., Villar L.M., Lampe E., Lewis-Ximenez L.L. Detection and molecular characterisation of a diagnosis escape variant associated with occult hepatitis B virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2017; 112(7):485–91. DOI: 10.1590/0074-02760160477.
21. Lazarevic I. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: recent advances. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(24):7653–64. DOI: 10.3748/wjg.v20.i24.7653.

Authors:

Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Zueva E.B., Saitgalina M.A., Ivanova A.R., Totolian Areg A. St. Petersburg Pasteur Institute. 14, Mira St., St. Petersburg, 197101, Russian Federation. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Semenov A.V. Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector". 23, Letnyaya St., Ekaterinburg, 620030, Russian Federation. E-mail: alexvsemenov@yahoo.com.

Bancevic M.D., Filipovic-Vignjevic S.B. Institute of Virology, Vaccines and Sera "Torlak". 458, Voevody Stepe St., Belgrade, 11152, Republic of Serbia. E-mail: mbancevic@torlak.rs.

Vasil'eva G.V., Zarya Ya.V. Limited Liability Company "Saint Petersburg Dialysis Center". 1, Severny Avenue, St. Petersburg, 194354, Russian Federation. E-mail: galina.vasilyeva@fmc-ag.ru.

Zhabasova A.S. St. Petersburg City Polyclinic No 17. 51, Shaumyan Avenue, St. Petersburg, 195112, Russian Federation. E-mail: her.infernal.majesty.95@mail.ru.

Об авторах:

Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Зуева Е.Б., Сайдгалина М.А., Иванова А.Р., Тотолян Арег А. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Семенов А.В. Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Российская Федерация, 620030, Екатеринбург, ул. Летняя, 23. E-mail: alexvsemenov@yahoo.com.

Банцевич М.Д., Филипович-Вигньевич С.Б. Институт вирусологии, вакцин и сывороток «Торлак». Республика Сербия, 11152, Белград, ул. Воеводы Степе, 458. E-mail: mbancevic@torlak.rs.

Васильева Г.В., Заря Я.В. ООО «Центр Диализа Санкт-Петербург». Российская Федерация, 194354, Санкт-Петербург, Северный пр., 1, лит. А. E-mail: galina.vasilyeva@fmc-ag.ru.

Жабасова А.С. Санкт-Петербургское ГБУЗ «Городская поликлиника № 17». Российская Федерация, 195112, Санкт-Петербург, пр. Шаумяна, 51. E-mail: her.infernal.majesty.95@mail.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-105-111

УДК 616.98:579.841.95(470.22)

Л.В. Рубис

**ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ТУЛЯРЕМИИ
НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАРЕЛИЯ***ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Российская Федерация*

Цель исследования – оценка эпидемиологической и эпизоотологической ситуации по туляремии на территории Республики Карелия, разработка комплекса профилактических (противоэпидемических) мероприятий. **Материалы и методы.** На основании материалов статистического наблюдения, первичной медицинской документации и литературных данных проанализированы заболеваемость населения, число привитых, результаты лабораторного исследования мелких млекопитающих, членистоногих и объектов внешней среды, видовой состав хозяев и переносчиков инфекции. Ситуация в республике сопоставлена с ситуацией в Финляндии и соседних областях России. **Результаты и обсуждение.** Заболеваемость туляремией регистрировалась в Республике Карелия в 1950–1971 гг. (52 случая) и в 2010–2020 гг. (121 случай). В последнее десятилетие диагностировалась преимущественно язвенно-бубонная форма, среди больных преобладало городское население. Во всех случаях заражение происходило при укусах насекомых, не связано с профессиональной деятельностью. Для республики характерны пойменно-болотный и лесной тип природных очагов. Результаты их мониторинга свидетельствуют об активизации эпизоотического процесса, охватывающего практически всю территорию Карелии. В нескольких районах, граничащих с неблагополучными районами Финляндии и России, выявлена высокая зараженность грызунов, но больные туляремией не регистрировались. Для адекватной оценки ситуации необходимо повышение эффективности мониторинга природных очагов, изучение иммунной структуры населения, улучшение диагностики инфекции. Основные направления профилактических (противоэпидемических) мероприятий: вакцинация лиц, имеющих профессиональный риск заражения, и лиц, проживающих вблизи активизирующихся микроочагов инфекции; сокращение площадей полей, не используемых в сельском хозяйстве; мелиоративные работы, борьба со свалками, регулярный вывоз коммунальных отходов с территорий постоянного и временного проживания населения; применение эффективных репеллентных средств; повышение информированности населения и органов исполнительной власти о ситуации, симптомах заболевания, мерах профилактики.

Ключевые слова: туляремия, эпизоотии, эпидемиология, грызуны, переносчики, вакцинация.

Корреспондирующий автор: Рубис Людмила Викторовна, e-mail: rublusja@mail.ru.

Для цитирования: Рубис Л.В. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по туляремии на территории Республики Карелия. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; 4:105–111. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-105-111

Поступила 28.04.2021. Отправлена на доработку 16.07.2021. Принята к публ. 04.10.2021.

L.V. Rubis**Epizootiological and Epidemiological Situation on Tularemia in the Republic of Karelia***Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russian Federation*

Abstract. The aim of this study was to assess the epidemiological and epizootiological situation on tularemia in the Republic of Karelia, and to develop a set of preventive (anti-epidemic) measures. **Materials and methods.** On the basis of statistical observation data, primary medical documentation and literature data, the morbidity of the population, the number of vaccinated persons, the results of laboratory studies of small mammals, arthropods and environmental objects, the species composition of hosts and vectors of infection were assessed. The situation in the republic was compared to the situation in Finland and neighboring regions of Russia. **Results and discussion.** The incidence of tularemia was registered in the Republic of Karelia in 1950–1971 (52 cases) and in 2010–2020 (121 cases). In the last decade, mainly the ulceroglandular forms have been diagnosed, the urban population predominated among the patients. In all cases, infection was transmitted through mosquito bites, i. e., not associated with professional activities. There are floodplain-swamp and forest types of natural foci in the republic. The results of their monitoring are indicative of the activation of the epizootic process, covering almost the entire territory of Karelia. In several areas bordering tularemia disadvantaged areas of Finland and Russia, a high infection rate of rodents was detected, but tularemia patients were not registered. For an adequate assessment of the situation, it is necessary to increase the efficiency of surveying natural foci, study the immune structure of the population and improve the diagnosis of infection. The main areas of preventive (anti-epidemic) measures are vaccination of persons with professional risk of infection and persons living near the activated micro-foci of infection; reduction of the area of fields not used in agriculture; reclamation work, combating landfills, regular removal of waste from the territories of permanent and temporary residence of the population; the use of effective repellents; raising awareness of the population and authorities about the situation, symptoms of the disease, measures of its prevention.

Key words: tularemia, epizootics, epidemiology, rodents, vectors, vaccination.

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

Corresponding author: Lyudmila V. Rubis, e-mail: rublusja@mail.ru.

Citation: Rubis L.V. Epizootiological and Epidemiological Situation on Tularemia in the Republic of Karelia. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:105–111. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-105-111
Received 28.04.2021. Revised 16.07.2021. Accepted 04.10.2021.

Rubis L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6602-9621>

Туляремия регистрируется во многих странах Европы, Азии и Северной Америки, проявляясь в основном спорадически, в отдельные годы – групповыми случаями и редкими вспышками. В Европе лидерами по заболеваемости являются Швеция и Финляндия [1, 2]. В России природные очаги туляремии существуют во всех федеральных округах, но их вклад в формирование заболеваемости варьируется в разные годы [3, 4]. Так, в 90-х гг. прошлого века Северный район, в настоящее время входящий в состав Северо-Западного федерального округа (СЗФО), был одним из трех регионов страны с наиболее высокой заболеваемостью [3], в 2001–2015 гг. на долю всего округа пришлось лишь 10,1 % от всех случаев туляремии в стране [5], а с 2016 г. округ вновь вошел в число лидеров [4, 6, 7]. Одним из самых неблагополучных субъектов страны в последние пять лет оказалась входящая в состав Северного района СЗФО Республика Карелия (РК), в которой туляремия до этого не регистрировалась в течение трех десятилетий.

Цель исследования – оценить эпидемиологическую и эпизоотологическую ситуацию по туляремии на территории РК для разработки адекватного комплекса профилактических (противоэпидемических) мероприятий.

Материалы и методы

В ходе исследования проанализирована заболеваемость туляремией в РК с 1950 по 2020 год на основании данных статистического наблюдения (форма № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»), материалов, опубликованных в Государственных докладах о состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия в РК в 2010–2020 гг. [8], первичной медицинской документации 20 пациентов ГБУЗ «Городская поликлиника № 4» Петрозаводска. У 1137 пациентов ГБУЗ «Больница скорой медицинской помощи» Петрозаводска, обратившихся в 2017–2019 гг. в связи с присасыванием клещей, оценено наличие симптомов, характерных для язвенно-бубонной формы туляремии. По данным формы статистического наблюдения № 5 «Сведения о профилактических прививках» проанализирована работа по вакцинации населения РК против туляремии с 1967 по 2020 год. Эпидемиологическая ситуация в РК сопоставлена с ситуацией в соседних областях России и Финляндии в 1995–2019 гг. на основании опубликованных аналитических и статистических материалов.

Видовой состав мелких млекопитающих и членистоногих – переносчиков *Francisella tularensis* в РК проанализирован по материалам Карельского научного центра РАН [9–14] и ФБУЗ «Центр гигие-

ны и эпидемиологии в Республике Карелия» [8]. Основанием для анализа активности природных очагов туляремии послужили данные Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Карелия (ранее – Республиканского центра госсанэпиднадзора в Республике Карелия) о результатах лабораторного исследования мелких млекопитающих, членистоногих, погадок хищных птиц, гнезд грызунов, воды поверхностных водоемов в 1980–2020 гг.

Результаты и обсуждение

Республика Карелия расположена в таежной зоне европейской части России, протяженность с севера на юг – 672 км, с запада на восток – 400 км. Разделена на 18 административных районов, граничит с Ленинградской, Архангельской, Вологодской, Мурманской областями и с Финляндией. Лесами покрыто 53,8 % территории. Является одним из наиболее заболоченных регионов: лесные болота и заболоченные леса занимают 10,6 %, слабооблесенные и открытые болота – 20,5 % территории площади РК. Климат характеризуется коротким прохладным летом и продолжительной, но относительно мягкой зимой [9].

Первая вспышка туляремии в РК зафиксирована в 1945 г. на территории граничащего с Финляндией Сортавальского района (число больных неизвестно). В 1950 г. на территории этого и соседних Питкярантского и Суоярвского районов выявлено 18 случаев, в 1953 г. – 21 случай в Суоярвском районе и 1 – в соседнем с ним Кондопожском районе, в 1958 г. – 6 случаев в Сортавальском районе. В 1961, 1963, 1967 и 1971 гг. выявлялись лишь единичные случаи туляремии (всего 6 случаев), причем уже в более восточных районах – окрестностях Петрозаводска, Пряжинском, Сегежском и Пудожском районах (рис. 1). Всего с 1950 по 1971 год зарегистрировано 52 случая инфекции. До 1983 г. предположительно выявлены, но не зарегистрированы, еще 2 случая – в Олонецком и Кемском районах. Из 52 больных 78,9 % являлись жителями сельской местности. Заражение происходило при укусах кровососущих членистоногих, в некоторых случаях – при переборке сена, соломы зерна.

Природные очаги туляремии в эти годы выявлялись на всех сопредельных с РК территориях России. Случаи заболеваний регистрировались в Ленинградской (с 1946 г.), Архангельской (с 1949 г.), Вологодской (с 1950 г.) и Мурманской (с 1955 г.) областях, возбудитель был изолирован на территории Ленинградской (1948 г.), Вологодской (1957 г.) и Архангельской (1969 г.) областей [5]. Природные очаги в Ленинградской области территориально близки к границе с Лахденпохским районом РК и

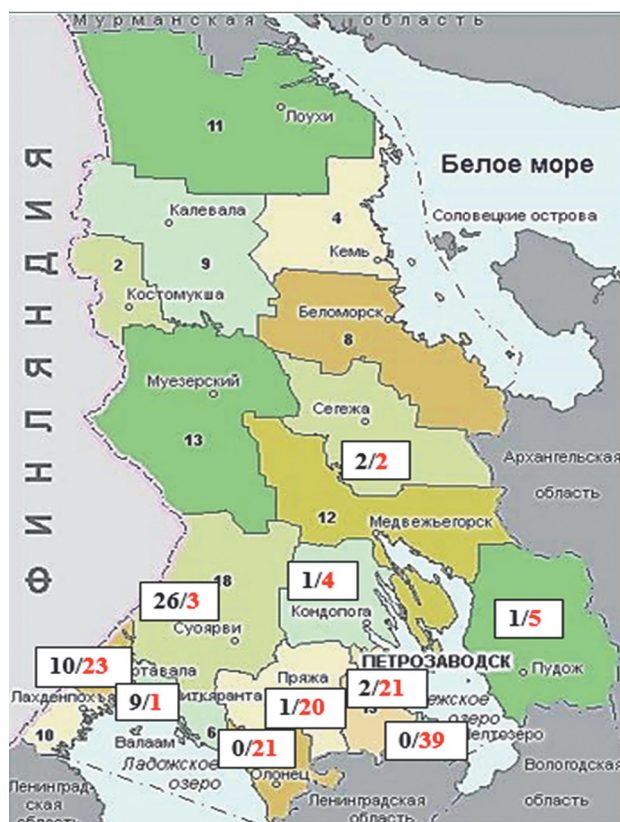


Рис. 1. Число больных туляремией, зарегистрированных по административным районам Республики Карелия в 1950–1971 гг. (черный цвет) и 2010–2020 гг. (красный цвет)

Fig. 1. The numbers of tularemia patients registered in the administrative districts of the Republic of Karelia in 1950–1971 (black color) and 2010–2020 (red color)

Финляндией. Имеются данные о случаях туляремии в Финляндии и Швеции в 1930-х гг., в основном связанных с укусами насекомых [15]. В 1982 г. вспышка среди фермеров Северной Финляндии (53 случая) возникла в результате реализации воздушно-капельного пути передачи возбудителя при заготовке сена, работе с сухим сеном, обмолоте зерна [16].

В августе 2009 г. случай заболевания с клинической картиной, типичной для язвенно-бубонной формы туляремии (острое начало, симптомы интоксикации, первичный аффект в области голени, затем паховый лимфаденит, оперативно вскрытый после нагноения), произошел в Сортавальском районе, но пациент лабораторно не обследован, диагноз туляремии не поставлен. В 2010 г. зарегистрировано три случая туляремии, причем первые два из них диагностированы в медицинских организациях Санкт-Петербурга. Заражение произошло на территории Сегежского, Олонецкого и Кондопожского районов. В 2012 г. зарегистрирован 1, в 2013 г. – 4, в 2015 г. – 2, в 2016 г. – 25 случаев инфекции. Пик заболеваемости пришелся на 2017 г. – 40 случаев. В 2018 и 2019 гг. число случаев снизилось до 14 и 9 соответственно, но в 2020 г. вновь выросло до 23. Всего за период 2010–2020 гг. зарегистрирован 121 случай туляремии. Наиболее часто заражение происходило в Прионежском (39 случаев), Сортавальском

(23 случая), Пряжинском (20 случаев) районах и Петрозаводске (21 случай), от 1 до 5 случаев зафиксировано в Пудожском, Суоярвском, Питкярантском, Олонецком, Кондопожском и Сегежском районах.

Больные туляремией выявлялись во всех соседних с РК областях СЗФО и Финляндии. В СЗФО в 2001–2015 гг. зарегистрировано 304 больных, из них 52,2 % – в Архангельской области (пик заболеваемости – 96 случаев в 2010 г. [17]), от 11,2 до 15,5 % – в Вологодской, Ленинградской областях и Санкт-Петербурге, 2,6 % – в Мурманской области [5]. В 2016–2019 гг. наиболее сложная эпидемиологическая ситуация сложилась в РК и Санкт-Петербурге [4, 6, 7]. В Финляндии число больных в 2001–2015 гг. было в 10 раз выше, чем в СЗФО [18]. Всего с начала регистрации туляремии в Финляндии в 1995 г. до 2019 г. зарегистрировано 5983 случая. Вспышки регистрировались в 2000, 2003 и 2016 гг. (926, 823 и 699 больных соответственно), в 1995–1996, 2006–2007 и 2009 гг. (около 400), в 2012 г. (233 больных). В 2019 г. зарегистрировано лишь 48 случаев [2, 18], в Центральной Швеции в этот год выявлено 979 больных [19]. По некоторым оценкам, в Финляндии лабораторно подтверждаются и регистрируются не более 10 % от всех случаев туляремии. Наличие иммуноглобулинов класса G к возбудителю туляремии обнаружено в среднем в 2 % из 1045 проб крови, собранных в 2000–2001 гг. Подавляющее число случаев болезни стабильно регистрируется в Центральной Финляндии, Северной и Южной Остроботнии, расположенных в центральной части страны и по побережью Ботнического залива [20]. Территория с высокой заболеваемостью (выше 20–40 на 100 тыс. населения) граничит с северными районами РК – Лоухским и частично Калевальским. Районы с уровнем заболеваемости от 5 до 20 на 100 тыс. населения близко расположены к границам Ленинградской области и Лахденпохскому району РК. Но в целом ареал распространения туляремии в Финляндии несколько удален от восточных границ, что может объяснять различие уровней заболеваемости в этой стране и РК (рис. 2).

По сравнению с предыдущим периодом эпидемиологического неблагополучия в РК в 2010–2020 гг. среди заболевших в 3,9 раза выросла доля городского населения, составив 82,6 %, что лишь отчасти связано с изменением структуры населения республики. Доля горожан среди ее жителей в 1953–1971 гг. составляла 64,9 %, в 2010–2020 гг. – 79,7 %. Среди детей выявлено 12 случаев (9,9 %), из них 8 – у проживающих в городах. Заражение не было связано с профессиональной деятельностью и происходило в основном на приусадебных участках, при работе на кладбище, при посещении леса, а также в лесопарковой зоне Петрозаводска. Во всех случаях установлен трансмиссивный механизм заражения при укусе насекомого, наиболее частой локализацией которого, по наблюдениям за пациентами поликлиники, была голень. Случаи туляремии регистрировались с кон-

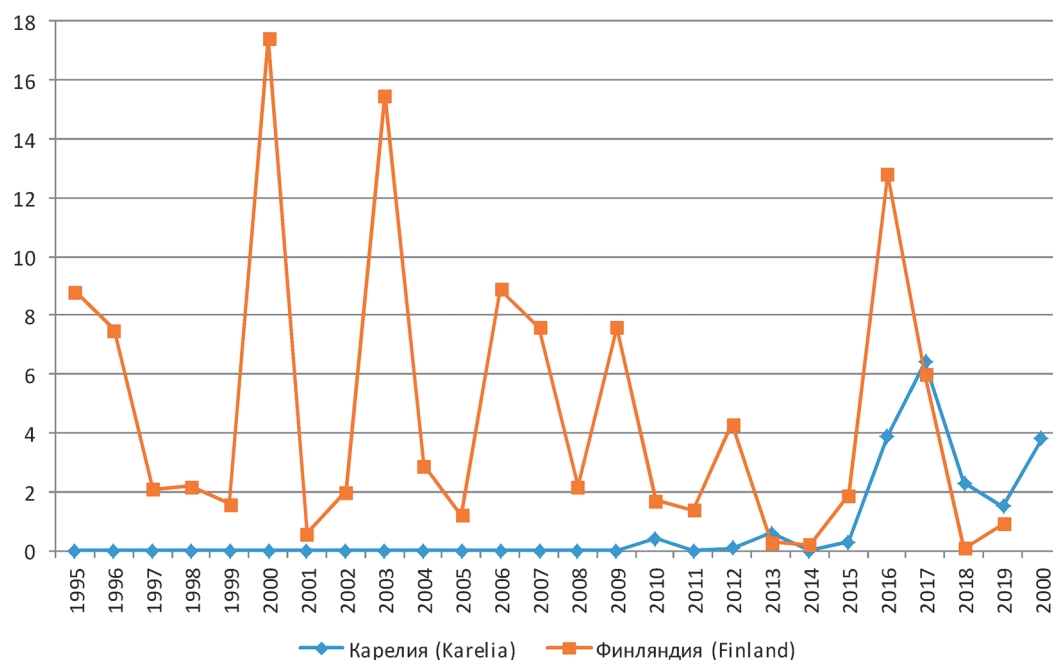


Рис. 2. Заболеваемость туляремией в Республике Карелия в 1995–2000 гг. и Финляндии в 1995–2019 гг. (на 100 тыс. населения)

Fig. 2. The incidence of tularemia in the Republic of Karelia in 1995–2020 and in Finland in 1995–2019 (per 100 000 of the population)

ца июля до конца октября, преимущественно в августе. Клинические формы удалось проанализировать у 56 пациентов: язвенно-бубонная форма составила 77,8 %, бубонная – 14,8 %, зафиксировано по одному случаю абдоминально-бубонной (укус насекомого в надлобковую область) и легочной формы. Тяжесть заболевания – легкая или средняя. Трансмиссивный механизм передачи возбудителя с преобладанием язвенно-бубонной формы инфекции характерен и для других территорий СЗФО [5, 17], Финляндии и Швеции [15, 20].

В 1967–1976 гг. против туляремии в восьми районах РК вакцинировано 81,7 тыс. человек (19,5 % населения), ревакцинировано 63,3 тыс. человек. Сельские жители среди привитых составили лишь 28,9 %, в то время как среди заболевших их доля в 2,7 раза больше. В последние годы вакцинация возобновилась, но в небольших объемах: в 2015–2018 гг. вакцинировано 75 человек, в 2019 г. – 865 человек, в 2020 г. работа не проводилась.

В рамках мониторинга природных очагов туляремии в последнее десятилетие ежегодно обследуются 7–11 районов РК (ранее 2–4 района). Результаты исследования на антиген *Fr. tularensis* мелких млекопитающих, их гнезд и помета, погадок хищных птиц в 1980–2020 гг. свидетельствуют об активизации эпизоотического процесса в этом веке, особенно в последнее десятилетие, по сравнению с 1980–1999 гг. (таблица). В последние десять лет частота обнаружения антигена при исследовании мелких млекопитающих колебалась от 1,9–5,7 % (2011–2015 и 2018 гг.) до 31,8 % (2016 г.) и 42,0–45,0 % (2010 и 2017 гг.). В 2019 и 2020 гг. она составила 27,0 и 23,8 % соответственно. Высокая частота положительных результатов в годы подъема заболеваемости (2016, 2017, 2020 гг.) являлась не только отражением активизации природных очагов инфекции, но и результатом более целенаправленного обследования территорий, с которыми связаны случаи заражения. Из 528 проб воды поверхностных водоемов, иссле-

Частота обнаружения антигенов *Francisella tularensis* при исследовании мелких млекопитающих и прочего материала в 1980–2020 гг. в Республике Карелия

The frequency of detection of *Francisella tularensis* antigens in the study of small mammals and other material in the Republic of Karelia in 1980–2020

Годы Years	Мелкие млекопитающие Small mammals			Погадки хищных птиц, гнезда, помет млекопитающих Regurgitates of birds of prey, nests, mammal droppings		
	исследовано проб number of samples examined	обнаружен антиген antigen was detected		исследовано проб number of samples examined	обнаружен антиген antigen was detected	
		абс. число abs. number	%		абс. число abs. number	%
1980–1989	424	44	10,4	–		
1990–1999	1160	98	8,5	327 (1998–1999)	22	6,7
2000–2004, 2007	345	64	18,6	633	30	4,7
2010–2020	2547	595	23,4	651	203	31,2

дованных методом биопроб в 1998–2020 гг., положительный результат получен в одном случае в 2016 г.

Признаки эпизоотической активности в разные годы выявлялись во всех районах республики. На основании критериев, содержащихся в СанПиН 3.3.686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»: регистрация заболеваний людей, выделение культур возбудителя от грызунов, членистоногих, объектов внешней среды или регулярное выявление антигена в погадках птиц и помете хищных млекопитающих, – природные очаги в Лахденпохском, Сортавальском, Питкярантском, Суоярвском, Олонецком, Пряжинском, Прионежском, Кондопожском, Сегежском, Кемском, Пудожском районах и Петрозаводске расценены как активные. В 2017–2020 гг. антиген *Fr. tularensis* обнаружили у мелких млекопитающих, собранных в 13 районах (всего 1157 особей), в том числе в тех, где больные туляремией никогда не выявлялись: в Лахденпохском (37,7 % из 122 проб), Лоухском (62,5 % из 24 проб), Калевальском (10,0 % из 30 проб), Муезерском (2 из 3 проб) районах и г. Костомукше (37,7 % из 53 проб). В районах, где регистрировались больные, показатель составил 15,9–29,9 %, за исключением Пудожского района, где все 37 исследованных зверьков оказались не инфицированы.

Большинство природных очагов туляремии относятся к пойменно-болотному типу, что характерно в целом для СЗФО [5]. В отдельных случаях очаги оценивались как луго-полевые, лесные или смешанного типа. Существование пойменно-болотных очагов поддерживается за счет водяной крысы и других околотовных млекопитающих, лесных – рыжих полевков и лесных мышей, луго-полевых – всех видов полевков и других млекопитающих (МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией»). В СЗФО культуры *Fr. tularensis* выделяли от различных видов грызунов и насекомых [5]. В Финляндии при исследовании вспышек показана роль полевков как источников инфекции, экспериментально доказана возможность их заражения, выявлена связь между изменением численности их популяции и заболеваемостью населения [20–23].

В РК обитают высокочувствительные к туляремии обыкновенная, рыжая, темная и водяная полевки, домашняя мышь, мышь-малютка, обыкновенная и средняя бурозубки, ондатра (завезена в РК в 1930-х гг. [9]) и менее чувствительные полевая мышь, черная и серая крысы, кутора [10]. Исследования, проведенные в 1950-х гг., показали преобладание в отловах мелких млекопитающих обыкновенной бурозубки и рыжей полевки (24,2 и 18,3 % соответственно), невысокую численность темной и обыкновенной полевков, лесной и полевой мыши, мыши-малютки (7,8–12,8 %), единичные находки водяной полевки и ондатры [10]. В современный период доминирование бурозубки обыкновенной и особенно рыжей полевки усилилось: в среднем за шесть лет (2012,

2014–2015, 2019–2020 гг.) из 2631 пойманного зверька рыжие полевки составили 43,5 %, обыкновенные бурозубки – 37,0 %, темные полевки – 7,1 %, мыши-малютки – 6,4 %, остальные виды – от 0,04 до 1,3 %. Водяная полевка не обнаруживалась. Численность зверьков в лесо-кустарниковых и луго-полевых станциях в 2013–2020 гг. была существенно выше, чем во влажных: 13,2; 12,8 и 2,9 на 100 ловушко-суток соответственно. Антиген *Fr. tularensis* наиболее часто выделялся при лабораторном исследовании обыкновенной бурозубки и рыжей полевки, существенно реже – темной полевки и мыши-малютки.

В разных типах природных очагов резервуаром и переносчиками инфекции являются разные виды клещей: в пойменно-болотных – *Ixodes apronophorus* и другие виды норковых клещей (*Laelaps muris*, *Haemolaelaps glasgowi*, *Hirstlonysus isabellinus*), в лесных – *I. ricinus*, *I. persulcatus* и *I. trianguliceps*, в луго-полевых – *Dermacentor reticulatus* и *D. pictus* [10, МУ 3.1.2007-05]. В Архангельской области инфицированность иксодовых клещей составила 9,7 % [17]. В Финляндии и Швеции в качестве основных переносчиков туляремии рассматривают комаров рода *Aedes*, роль *Ae. cinereus* подтверждена во время расследования вспышки в Швеции в 2019 г. [15, 19]. В РК обитают *L. muris* и *H. isabellinus*, зараженность ими бурозубки обыкновенной и рыжей полевки невысока – 0–29,5 % [10]. Видовой состав иксодовых клещей в основном представлен *I. persulcatus* и *I. trianguliceps*, реже – *I. ricinus* и *D. marginatus* [11, 12]. При исследовании гамазовых клещей и блох методом биопроб в 2010–2015 гг. (60 проб), а также иксодовых клещей – методом ПЦР в 2016–2020 гг. (551 клещ) в одном случае обнаружены ДНК *Fr. tularensis*.

Несмотря на то, что в РК ежегодно 3–4 тыс. человек обращаются за медицинской помощью по поводу присасывания клещей, случаев заражения туляремией, связанных с клещами, не выявлено. Анализ записей в медицинской документации 1137 пациентов, у которых присасывание клещей произошло в мае – сентябре 2017–2019 гг. (в основном на территории Прионежского и Пряжинского районов), также не выявил лиц с симптомами первичного аффекта в месте присасывания клеща и регионального лимфаденита. У пациентов, пострадавших от клещей, зараженных возбудителями других заболеваний, имели место отсутствие лихорадки и нормальный размер лимфатических узлов в течение месяца, пока они наблюдались инфекционистами. Ни в одном случае в течение месяца после удаления клеща пациенты не обращались к хирургам.

Все случаи заражения в 2010–2020 гг. связаны с укусами насекомых. На территории РК обнаружен 31 вид и подвид кровососущих комаров с преобладанием рода *Aedes*, 37 видов кровососущих мошек, 15 видов мокрецов и 36 видов слепней [13]. На зараженность *Fr. tularensis* насекомые не исследовались. Массовое нападение гнуса на теплотрассы,

как правило, наблюдается в июне – первой половине июля [13], что совпадает с периодом распространения туляремии среди грызунов. Мокрецы имеют второй период активности – в августе, что соответствует периоду максимальной частоты заражений людей. Помимо обычных для летающих кровососущих типов нападения, у мокрецов выявлен еще один – напозвание по ногам, что определяет локализацию укусов на голени [14].

Результаты мониторинга природных очагов туляремии в РК свидетельствуют об активизации эпизоотического процесса и его распространении практически на всю ее территорию. Резервуар инфекции, имеющий наибольшее эпидемиологическое значение в настоящее время, по-видимому, составляют рыжая полевка и обыкновенная бурозубка, что обусловлено высокими индексами их доминирования и показателями численности. Активное участие в эпизоотическом процессе рыжей полевки и обыкновенной бурозубки говорит о том, что помимо пойменно-болотного для РК в настоящее время характерен лесной тип очага. Переносчиками, с которыми связано заражение людей, являются кровососущие насекомые, но роль отдельных видов членистоногих, участвующих в сохранении природных очагов и заражении людей, требует дальнейшего изучения.

Эпидемиологическая ситуация в 2010–2020 гг. отличается от ситуации в 50–60-х гг. прошлого века более высоким уровнем заболеваемости с преобладанием язвенно-бубонной формы, активным вовлечением в процесс городского населения, отсутствием среди больных лиц, чья профессиональная деятельность связана с пребыванием в природных очагах инфекции. Для объективной оценки ситуации необходимы проведение анализа иммунной структуры разных групп населения и повышение настороженности медицинских работников в отношении диагностики туляремии, особенно в Лахденпохском и северных районах РК. Необходимо повышение информированности населения и органов исполнительной власти об эпизоотологической ситуации, актуальном для региона механизме заражения, характерных для заболевания симптомах, мерах личной и общественной профилактики.

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

Список литературы

1. WHO Guidelines on Tularaemia. World Health Organization. 2007; 125 p. [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_EPR_2007_7.pdf?ua=1 (дата обращения 01.04.2021).
2. Tularaemia. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2019. Stockholm: ECDC; 2021. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/tularaemia> (дата обращения 01.04.2021).
3. Покровский В.И., Онищенко Г.Г., Черкасский Б.А. Эволюция инфекционных болезней в XX веке: руководство для врачей. М.: Медицина; 2003. С. 184–214.
4. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Холин А.В., Мазепа А.В., Куликалова Е.С., Транквилевский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Эпизоотолого-эпидемиологическая

ситуация по туляремии на территории Российской Федерации в 2019 г. и прогноз на 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:21–32. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-21-32.

5. Демидова Т.Н., Попов В.П., Орлов Д.С., Михайлова Т.В., Мещерякова И.С. Современная эпидемиологическая ситуация по туляремии в Северо-Западном федеральном округе России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 5:14–23. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-5-14-23.

6. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Мазепа А.В., Холин А.В., Холин А.В., Куликалова Е.С., Храмов М.В., Дятлов И.А., Транквилевский Д.В. Эпидемиологический и эпизоотологический анализ ситуации по туляремии в Российской Федерации в 2016 г., прогноз на 2017 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 2:13–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-13-18.

7. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Пакскина Н.Д., Холин А.В., Мазепа А.В., Куликалова Е.С., Транквилевский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Туляремия: актуальные вопросы и прогноз эпидемической ситуации на территории Российской Федерации в 2018 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 1:22–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-22-29.

8. Государственные доклады о состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия в Республике Карелия в 2010–2020 гг. [Электронный ресурс]. URL: <https://10.rospotreb-nadzor.ru> (дата обращения 24.07.2021).

9. Громцев А.Н., Китаев С.П., Крутов В.И., Кузнецов О.Л., Лихдольм Т., Яковлев Е.Б., редакторы. Разнообразие биоты Карелии: условия формирования, сообщества, виды. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН; 2003. 262 с.

10. Шульман Р.Е. К фауне гамазовых клещей с мелких млекопитающих Карелии. В кн.: Труды Карельского филиала Академии наук СССР. Вып. 30. С. 107–28. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР; 1961. [Электронный ресурс]. URL: http://resources.krc.karelia.ru/library/doc/articles/k_faune_gamazovyh.pdf (дата обращения 24.07.2021).

11. Беспятова Л.А., Бугмырин С.В., Кутенков С.А., Никонорова И.А. Численность иксодовых клещей (*Acarixodidae*) на мелких млекопитающих в лесных биотопах среднетаежной подзоны Карелии. *Паразитология*. 2019; 6:463–73. DOI: 10.1134/S0031184719060036.

12. Бугмырин С.В., Беспятова Л.А., Котовский Н.Ю., Иешко Е.П. Видовой состав и численность иксодовых клещей (*Acarixodidae*) в г. Петрозаводске (Республика Карелия, Россия). *Труды Карельского научного центра РАН*. 2016; 3:67–75. DOI: 10.17076/bg225.

13. Шарков А.А., Бобровских Т.К., Быкова Х.И. Методические рекомендации по использованию календаря активности кровососущих членистоногих Карелии. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР; 1985. 13 с.

14. Лутта А.С. О паразитологических исследованиях в Карелии. В кн.: Труды Карельского филиала Академии наук СССР. Вып. 30. С. 3–23. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР; 1961. [Электронный ресурс]. URL: http://resources.krc.karelia.ru/library/doc/articles/o_parazitologicheskikh.pdf (дата обращения 24.07.2021).

15. Abdellahoum Z., Maurin M., Bitam I. Tularaemia as a Mosquito-Borne Disease. *Microorganisms*. 2021; 9(1):26. DOI: 10.3390/microorganisms9010026.

16. Syrjälä H., Kujala P., Myllylä V., Salminen A. Airborne transmission of tularaemia in farmers. *Scand. J. Infect. Dis*. 1985; 17:371–5. DOI: 10.3109/13813458909558777.

17. Бурмагина И.А., Агафонов В.М. Характеристика туляремии в Северном регионе. В кн.: Стратулат П.М., Архипова Л.Ю., Волков В.П., Лебединцева Е.А., редакторы. Современная медицина: актуальные вопросы. Новосибирск: СибАК; 2013. С. 33–9. [Электронный ресурс]. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/harakteristika-tulyaremi-v-severnom-regione/viewer> (дата обращения 01.04.2021).

18. Infectious Diseases in Finland. Annual Reports, 2011–2015. [Электронный ресурс]. URL: <https://thl.fi/en/web/infectious-diseases-and-vaccinations/surveillance-and-registers/infectious-diseases-in-finland-publications> (дата обращения 24.07.2021).

19. Dryselius R., Hjertqvist M., Mäkitalo S., Lindblom A., Lilja T., Eklöf D., Lindström A. Large outbreak of tularaemia, central Sweden, July to September 2019. *Euro Surveill*. 2019; 24(42):1900603. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.42.1900603.

20. Rossow H., Ollgren J., Hytönen J., Rissanen H., Huitu O., Henttonen H., Kuusi M., Vapalahti O. Incidence and seroprevalence of tularaemia in Finland, 1995 to 2013: regional epidemics with cyclic pattern. *Euro Surveill*. 2015; 20(33):21209. DOI: 10.2807/1560-7917.es2015.20.33.21209.

21. Hestvir G., Warns-Petit E., Smith L.A., Fok N.J., Uhlorn H., Artois M., Hannant D., Hutchings M.R., Matisson R., Yon L., Gavriel-Widen D. The status of tularaemia in Europe in a one-health context: a review. *Epidemiol. Infect.* 2015; 143(10):2137–60. DOI: 10.1017/S0950268814002398.

22. Rossow H., Forbes K.M., Tarkka E., Kinnunen P.M., Hemmälä H., Huitu O., Nikkari S., Henttonen H., Kipar A.,

Vapalahti O. Experimental Infection of voles with *Francisella tularensis* indicates their amplification role in tularemia outbreaks. *PLoS ONE*. 2014; 9(10):e108864. DOI: 10.1371/journal.pone.0108864.

23. Rotejanaprasert C., Lawson A., Rossow H., Sane J., Huitu O., Henttonen H., Del Rio Vilas V.J. Towards integrated surveillance of zoonoses: spatiotemporal joint modeling of rodent population data and human tularemia cases in Finland. *BMC Med. Res. Methodol.* 2018; 18(1):72. DOI: 10.1186/s12874-018-0532-8.

References

1. WHO Guidelines on Tularemia. World Health Organization; 2007. 125 p. (Cited 01 Apr 2021). [Internet]. Available from: https://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_EPR_2007_7.pdf?ua=1.

2. Tularaemia. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2019. Stockholm: ECDC; 2021. (Cited 01 Apr 2021). [Internet]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/tularaemia>.

3. Pokrovsky V.I., Onishchenko G.G., Cherkassky B.A. [The Evolution of Infectious Diseases in the 20th Century: A Guide for Physicians]. Moscow: "Meditsina"; 2003. P. 184–214.

4. Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Kholin A.V., Mazepa A.V., Kulikalova E.S., Trankvilevsky D.V., Khranov M.V., Dyatlov I.A. [Epidemiological and epizootiological situation on tularemia in Russia and neighboring countries in 2019, the forecast for 2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 1:21–32. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-21-32.

5. Demidova T.N., Popov V.P., Orlov D.S., Mikhailova T.V., Meshcheryakova I.S. [The current epidemiological situation on tularemia in the Northwestern Federal District of Russia]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2016; 5:14–23. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-5-14-23.

6. Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Mazepa A.V., Okunev L.P., Kholin A.V., Kulikalova E.S., Khranov M.V., Dyatlov I.A., Trankvilevsky D.V. [Epidemiological and epizootiological situation on tularemia in the Russian Federation in 2016, the Forecast for 2017]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 2:13–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-13-18.

7. Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Pakskina N.D., Kholin A.V., Mazepa A.V., Kulikalova E.S., Trankvilevsky D.V., Khranov M.V., Dyatlov I.A. Tularemia: topical issues and forecast of the epidemic situation in the territory of the Russian Federation in 2018. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 1:22–29. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-22-29.

8. [State reports on the state of sanitary and epidemiological welfare in the Republic of Karelia in 2010–2020]. (Cited 24 July 2021). [Internet]. Available from: <https://10.rospotrebnadzor.ru>.

9. Gromtsev A.N., Kitaev S.P., Krutov V.I., Kuznetsov O.L., Likhdkholm T., Yakovlev E.B., editors. [Diversity of Biota of Karelia: Conditions of Formation, Communities, Species]. Petrozavodsk: Karelia Scientific Center of RAN; 2003. 262 p.

10. Shul'man R.E. [Regarding Fauna of Gamaside Mites from Small Mammals of Karelia]. Petrozavodsk: Karelia Affiliated Branch of USSR AS; 1961. 128 p. (Cited 24 July 2021). [Internet]. Available from: http://resources.krc.karelia.ru/library/doc/articles/k_faune_gamazovyh.pdf.

11. Bespyatova L.A., Bugmyrin S.V., Kutenkov S.A., Nikonorova I.A. [Abundance of Ixodidae ticks (*Acari Ixodidae*) on small mammals in forest biotopes of the middle taiga subzone of Karelia]. *Parazitologia. [Parasitology]*. 2019; 6:463–73. DOI: 10.1134/S0031184719060036.

12. Bugmyrin S.V., Bespyatova L.A., Kotovsky N.Yu., Ieshko E.P. [Species composition and number of Ixodidae ticks (*Acari Ixodidae*) in Petrozavodsk (Republic of Karelia, Russia)]. *[Works of Karelia Scientific Center of RAS]*. 2016; 3:67–75. DOI: 10.17076/bg225.

13. Sharkov A.A., Bobrovskikh T.K., Bykova Kh.I. [Methodological recommendations on the use of the calendar of activity of blood-sucking arthropods in Karelia]. Petrozavodsk: Karelia Affiliated Branch of the USSR AS; 1985. 13 p.

14. Lutta A.S. [On parasitological research in Karelia]. In: [Works of the Karelia Affiliated Branch of the USSR AS]. Petrozavodsk; 1961. Issue 30. P. 3–23. (Cited 24 July 2021). [Internet]. Available from: http://resources.krc.karelia.ru/library/doc/articles/o_parazitologicheskikh.pdf.

15. Abdellahoum Z., Maurin M., Bitam I. Tularemia as a Mosquito-Borne Disease. *Microorganisms*. 2021; 9(1):26. DOI: 10.3390/microorganisms9010026.

16. Syrjälä H., Kujala P., Myllylä V., Salminen A. Airborne transmission of tularemia in farmers. *Scand. J. Infect. Dis.* 1985; 17:371–5. DOI: 10.3109/13813458090558777.

17. Burmagina I.A., Agafonov V.M. [Characteristics of tularemia in the Northern region]. In: Stratulat P.M., Arkhipova L.Yu., Volkov V.P., Lebedintseva E.A., editors. [Modern Medicine: Relevant Issues]. Novosibirsk: "SibAK"; 2013. P. 33–9. (Cited 01 Apr 2021). [Internet]. Available from: <https://sibac.info/archive-article>.

18. Infectious Diseases in Finland. Annual Reports, 2011–2015. (Cited 24 July 2021). [Internet]. Available from: <https://thl.fi/en/web/infectious-diseases-and-vaccinations/surveillance-and-registers/infectious-diseases-in-finland-publications>.

19. Dryselius R., Hjertqvist M., Mäkitalo S., Lindblom A., Lilja T., Eklöf D., Lindström A. Large outbreak of tularemia, central Sweden, July to September 2019. *Euro Surveill.* 2019; 24(42):1900603. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.42.1900603.

20. Rossow H., Ollgren J., Hytönen J., Rissanen H., Huitu O., Henttonen H., Kuusi M., Vapalahti O. Incidence and seroprevalence of tularemia in Finland, 1995 to 2013: regional epidemics with cyclic pattern. *Euro Surveill.* 2015; 20(33):21209. DOI: 10.2807/1560-7917.es2015.20.33.21209.

21. Hestvir G., Warns-Petit E., Smith L.A., Fok N.J., Uhlorn H., Artois M., Hannant D., Hutchings M.R., Matisson R., Yon L., Gavier-Widen D. The status of tularemia in Europe in a one-health context: a review. *Epidemiol. Infect.* 2015; 143(10):2137–60. DOI: 10.1017/S0950268814002398.

22. Rossow H., Forbes K.M., Tarkka E., Kinnunen P.M., Hemmälä H., Huitu O., Nikkari S., Henttonen H., Kipar A., Vapalahti O. Experimental Infection of voles with *Francisella tularensis* indicates their amplification role in tularemia outbreaks. *PLoS ONE*. 2014; 9(10):e108864. DOI: 10.1371/journal.pone.0108864.

23. Rotejanaprasert C., Lawson A., Rossow H., Sane J., Huitu O., Henttonen H., Del Rio Vilas V.J. Towards integrated surveillance of zoonoses: spatiotemporal joint modeling of rodent population data and human tularemia cases in Finland. *BMC Med. Res. Methodol.* 2018; 18(1):72. DOI: 10.1186/s12874-018-0532-8.

Authors:

Rubis L.V. Petrozavodsk State University. 33, Lenin Avenue, Petrozavodsk, 185910, Russian Federation. E-mail: rublusja@mail.ru.

Об авторах:

Рубис Л.В. Петрозаводский государственный университет. Российская Федерация, 185910, Петрозаводск, пр. Ленина, 33. E-mail: rublusja@mail.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-112-119

УДК 616.98:579.852.11(470.45)

А.Г. Рязанова¹, Д.К. Герасименко¹, **Н.П. Буравцева¹**, В.М. Мезенцев¹, Ф.В. Логвин², Т.М. Головинская¹,
О.В. Семенова¹, Л.Ю. Аксенова¹, С.В. Перехожева³, Д.К. Чмеренко¹, А.Н. Куличенко¹

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕОИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОЙ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБСТАНОВКИ ПО СИБИРСКОЙ ЯЗВЕ В ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», Ростов-на-Дону, Российская Федерация;

³Управление Роспотребнадзора по Волгоградской области, Волгоград, Российская Федерация

Цель исследования – оценка эпизоотологической и эпидемиологической обстановки по сибирской язве в Волгоградской области в 1920–2019 гг., районирование территории по степени неблагополучия по инфекции с использованием геоинформационных технологий. **Материалы и методы.** Изучены отчетные данные Управления Роспотребнадзора, Комитета ветеринарии Волгоградской области, литературные источники. ГИС-платформой послужила программа ESRI-ArcGIS 10. При районировании по степени неблагополучия по сибирской язве административных территорий области применен индекс эпизоотичности. **Результаты и обсуждение.** В настоящее время в Волгоградской области зафиксировано 529 стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов, находящихся в 33 районах, учтено 53 сибиреязвенных захоронения в 20 районах. За период 1970–2019 гг. выявлено 226 случаев инфекции сельскохозяйственных животных и 37 случаев сибирской язвы среди людей. Большинство стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (347 пунктов, 66 %) сформировано в период 1930–1949 гг. Максимум активности инфекции отмечен в 1930–1959 гг. Проведено районирование территории Волгоградской области с использованием ESRI-ArcGIS 10, в результате чего муниципальные районы разделены на четыре группы по степени неблагополучия в отношении сибирской язвы. Изучена потенциальная опасность различных почвенно-ландшафтных зон в сохранении сибиреязвенного микроба. Выявлено, что черноземные, каштановые, темно-каштановые типы почв, занимающие более 50 % всей площади области и преобладающие в зонах умеренно-засушливых, сухих степей, наряду с аллювиальными луговыми почвами речных долин, пойм рек весьма благоприятны для сохранения возбудителя сибирской язвы. Территория Волгоградской области эндемична по данной инфекции, а эпизоотолого-эпидемиологическое благополучие в регионе во многом зависит от полноты, своевременности проведения комплекса профилактических мероприятий. Применение геоинформационных технологий обеспечивает всесторонний анализ проявлений активности инфекции с достоверным совершенствованием системы противосибиреязвенного надзора, организацией контроля в принятии дифференцированных управленческих решений.

Ключевые слова: сибирская язва, эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка, заболеваемость, стационарно неблагополучный по сибирской язве пункт, сибиреязвенное захоронение, ГИС-технологии.

Корреспондирующий автор: Рязанова Алла Геннадьевна, e-mail: anthraxlab.stv@mail.ru.

Для цитирования: Рязанова А.Г., Герасименко Д.К., Буравцева Н.П., Мезенцев В.М., Логвин Ф.В., Головинская Т.М., Семенова О.В., Аксенова Л.Ю., Перехожева С.В., Чмеренко Д.К., Куличенко А.Н. Применение геоинформационных технологий для оценки эпизоотологической и эпидемиологической обстановки по сибирской язве в Волгоградской области. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:112–119. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-112-119

Поступила 20.08.2020. Отправлена на доработку 15.03.2021. Принята к публ. 10.11.2021.

A.G. Ryazanova¹, D.K. Gerasimenko¹, **N.P. Buravtseva¹, V.M. Mezentsev¹, F.V. Logvin²,
T.M. Golovinskaya¹, O.V. Semenova¹, L.Yu. Aksenova¹, S.V. Perekhovzheva³, D.K. Chmerenko¹,
A.N. Kulichenko¹**

Application of Geoinformation Technologies for Assessment of the Epizootiological and Epidemiological Situation on Anthrax in the Volgograd Region

¹Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation;

²Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation;

³Rospotrebnadzor Administration in the Volgograd Region, Volgograd, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to assess the epizootiological and epidemiological situation on anthrax in the Volgograd Region in the period of 1920–2019, to zone the territory according to the degree of disadvantage as regards anthrax using geographic information technologies. **Materials and methods.** The reporting data of the Rospotrebnadzor Administration, Veterinary Committee in the Volgograd Region, and literature sources were studied. ESRI-ArcGIS 10 software was used as a GIS-platform. Epizootic index was applied in the zoning according to the degree of disadvantage regarding anthrax in the territories of the region. **Results and discussion.** Currently, 529 stationary potentially hazardous as regards anthrax areas have been registered in 33 districts of the Volgograd Region, 53 anthrax burial sites are accounted for in 20 districts. During the period of 1970–2019, 226 cases of infection of farm animals and 37 cases of anthrax among humans were detected. Most of the stationary potentially hazardous as regards anthrax areas (347 sites, 66 %) were formed in 1930–1949. Maximum activity was observed in 1930–1959. The zoning of the territory of the Volgograd Region was carried out using ESRI-ArcGIS 10 software, as a result of which the municipal districts were divided into four groups according to the degree of disadvantage regarding anthrax. The potential of different soil and landscape zones in the persistence of the anthrax microbe was studied. It has been found that chernozem, chestnut, dark-chestnut soil

types, which occupying more than 50 % of the total region area and predominate in the zones of moderately arid and dry steppes, alongside alluvial meadow soils of river valleys, floodplains of rivers are very favorable for the persistence of the anthrax pathogen. The territory of the Volgograd Region is endemic for this infection and epizootiological and epidemiological well-being in the region largely depends on the completeness and timelines of preventive measures. The use of geographic information technologies provides a comprehensive analysis of the infection activity manifestations with reliable improvement of the anti-anthrax surveillance system and control in making differentiated managerial decisions.

Key words: anthrax, epizootiological and epidemiological situation, morbidity, stationary potentially hazardous as regards anthrax area, anthrax burial site, GIS-technologies.

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

Corresponding author: Alla G. Ryazanova, e-mail: anthraxlab.stv@mail.ru.

Citation: Ryazanova A.G., Gerasimenko D.K., Buravtseva N.P., Mezentsev V.M., Logvin F.V., Golovinskaya T.M., Semenova O.V., Aksenova L.Yu., Perekhozheva S.V., Chmerenko D.K., Kulichenko A.N. Application of Geoinformation Technologies for Assessment of the Epizootiological and Epidemiological Situation on Anthrax in the Volgograd Region. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:112–119. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-112-119

Received 20.08.2021. Revised 15.03.2021. Accepted 10.11.2021.

Ryazanova A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>
Gerasimenko D.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8636-6585>
Buravtseva N.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0756-5405>
Mezentsev V.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0613-861X>
Logvin F.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4410-1677>

Golovinskaya T.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6475-4512>
Semenova O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0274-898X>
Aksenova L.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7744-3112>
Chmerenko D.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2143-2668>
Kulichenko A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в борьбе с сибирской язвой, современная эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка по данной инфекции в странах мира продолжает оставаться напряженной, неустойчивой, далекой от благополучия [1–3].

Регион Южного федерального округа (ЮФО), наряду с Северо-Кавказским, исторически всегда характеризовался нестабильностью в отношении сибирской язвы, высокой заболеваемостью сибирезавенной инфекцией животных и людей, что в значительной мере связано с широкой распространенностью на юге России стойких почвенных очагов сибирской язвы, в которых сохраняется угроза возникновения повторных вспышек инфекции в течение многих десятилетий [4–6].

Волгоградская область, расположенная на юго-востоке Русской равнины, является важным агроэкономическим субъектом ЮФО с многоотраслевым сельским хозяйством, развитым животноводством и обеспечивает тесные торгово-транспортные отношения России со странами Европы и Центральной Азии [7–8].

На территории Волгоградской области, отличающейся наличием достаточно большого количества стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП), неучтенных сибирезавенных захоронений (СЯЗ), имеются определенные риски возникновения эпизоотий сибирской язвы, случаев инфекции среди людей, ухудшения эпизоотолого-эпидемиологической ситуации [9]. В связи с этим возникает необходимость детального изучения активности сибирской язвы в прошлом, в современных условиях, слежения за состоянием, активизацией почвенных очагов и СНП. Применение технологий географических информационных систем (ГИС-технологий) как эффективного метода регистрации и анализа способствует систематизации данных, совершенствованию общего эпизоотолого-эпидемиологического надзора за инфекцией [10].

Цель работы – оценка эпизоотологической и эпидемиологической обстановки по сибирской язве в Волгоградской области в течение 1920–2019 гг., районирование территории по степени неблагополучия по инфекции с использованием ГИС-технологий.

Материалы и методы

Для характеристики эпизоотолого-эпидемиологической обстановки по сибирской язве в Волгоградской области проанализированы материалы Комитета ветеринарии, Управления Роспотребнадзора по Волгоградской области, справочные издания и литературные источники. В среде программы Microsoft Excel разработана геоинформационная база данных СНП и СЯЗ, в которую вносились актуализированные сведения по административным районам, населенным пунктам, хозяйствам и др., где зарегистрированы проявления сибирской язвы с включением лет регистрации инфекции, данных о количестве и видовом составе павших животных, числе больных людей, а также географических координатах размещения СНП и СЯЗ. Информация базы данных вводилась в ГИС-программу ESRI-ArcGIS10 для построения нозогеографических электронных карт (м. 1:200000) с пространственной моделью расположения СНП и СЯЗ в виде отдельных условных знаков (точек и т.п.) [11–14]. При районировании территории области по степени неблагополучия по сибирской язве использован индекс эпизоотичности (ИЭ) по М.Г. Таршису [15]: $ИЭ = (n \cdot t) : (N \cdot T)$, где n – число СНП в районе; t – число лет, в течение которых отмечена активность инфекции в районе; N – число всех населенных пунктов в районе; T – общее число лет наблюдения.

Результаты и обсуждение

Для изучения особенностей эпизоотологической и эпидемиологической обстановки по сибирской язве

в Волгоградской области проанализировано 10 десятилетних временных периодов за 100 лет, с 1920 по 2019 год. При этом стоит учесть, что официальная регистрация сибирской язвы в области стала проводиться с 1900 г. [16]. В настоящее время в Волгоградской области актуализированы данные о 529 СНП, зафиксированных во всех 33 муниципальных районах (таблица). Наибольшее число СНП (46) зарегистрировано в Урюпинском районе, на территории восьми районов (Алексеевский, Жирновский, Еланский, Камышинский, Котельниковский, Нехаевский, Серафимовичский, Суровикинский) размещено от

20 до 26 пунктов, а в остальных 24 районах локализовано менее 20 СНП. Наименьшее количество СНП отмечено в четырех районах: Кумылженском (5 СНП), Новоаннинском (3), Руднянском (4), Чернышковском (4). В ходе рассмотрения особенностей формирования СНП в Волгоградской области показано, что в первом десятилетнем периоде (1920–1929 гг.) появилось 11 СНП (2,1 %), а большинство неблагополучных пунктов сформировано в 1930–1949 гг. – 347 СНП (66 %). В дальнейшие годы появление новых СНП резко сокращалось: с 1950 по 1959 год выявлено 92 СНП (17,4 %), с 1960 по 1969

Формирование стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов в Волгоградской области по периодам в течение 1920–2019 гг.

The formation of the stationary potentially hazardous as regards anthrax areas in the Volgograd Region by the periods during 1920–2019

Районы / Districts		Кол-во СНП Number of anthrax areas	Периоды, годы Periods, years								
			1920– 1929	1930– 1939	1940– 1949	1950– 1959	1960– 1969	1970– 1979	1980– 1989	1990– 1999	2000– 2019
Алексеевский / Alekseevsky		21	–	11	4	4	2	–	–	–	–
Быковский / Bykovsky		14	–	9	3	–	1	1	–	–	–
Городищенский / Gorodishchensky		9	–	6	–	1	1	–	1	–	–
Даниловский / Danilovsky		16	–	2	4	8	2	–	–	–	–
Дубовский / Dubovsky		17	1	15	–	1	–	–	–	–	–
Еланский / Elansky		20	–	1	10	2	6	1	–	–	–
Жирновский / Zhirnovsky		21	–	7	8	4	2	–	–	–	–
Иловлинский / Ilovlinsky		18	–	5	6	6	1	–	–	–	–
Калачевский / Kalachevsky		17	–	8	3	5	–	1	–	–	–
Камышинский / Kamyshin		25	–	5	11	9	–	–	–	–	–
Киквидзенский / Kikvidzensky		10	–	6	1	2	1	–	–	–	–
Клетский / Kletsky		19	–	6	3	4	3	3	–	–	–
Котельниковский / Kotel’nikovsky		26	–	19	3	3	1	–	–	–	–
Котовский / Kotovsky		15	–	9	3	–	3	–	–	–	–
Кумылженский / Kumylzhensky		5	–	–	–	2	3	–	–	–	–
Ленинский / Leninsky		16	–	12	2	–	1	1	–	–	–
Михайловский / Mikhailovsky		7	–	–	4	2	1	–	–	–	–
Нехаевский / Nekhaevsky		21	–	3	5	7	4	1	–	–	1
Николаевский / Nikolaevsky		10	–	10	–	–	–	–	–	–	–
Новоаннинский / Novoanninsky		3	–	–	–	2	1	–	–	–	–
Новониколаевский / Novonikolaevsky		17	–	5	11	–	1	–	–	–	–
Октябрьский / Oktyabrsky		19	–	4	8	5	2	–	–	–	–
Ольховский / Olkhovsky		11	–	7	1	1	2	–	–	–	–
Палласовский / Pallasovsky		6	–	–	–	–	5	1	–	–	–
Руднянский / Rudnyansky		4	–	–	–	–	2	1	1	–	–
Светлоярский / Svetloyarsky		11	1	4	3	–	2	1	–	–	–
Серафимовичский / Serafimovichsky		23	–	6	4	9	3	1	–	–	–
Среднеахтубинский / Sredneahhtubinsky		16	–	6	8	2	–	–	–	–	–
Старополтавский / Staropoltavsky		18	–	9	5	–	2	2	–	–	–
Суровикинский / Surovikinsky		25	–	7	10	6	1	–	–	–	1
Урюпинский / Uryupinsky		46	9	17	12	6	1	–	–	1	–
Фроловский / Frolovsky		19	–	8	8	1	2	–	–	–	–
Чернышковский / Chernyshkovsky		4	–	–	–	–	4	–	–	–	–
Итого	абс. / abs.	529	11	207	140	92	60	14	2	1	2
Total	%	100	2,08	39,13	26,47	17,39	11,34	2,65	0,38	0,19	0,38

год – 60 (11,3 %), с 1970 по 1979 год – 14 (2,7 %), с 1980 по 2019 год – 5 (0,95 %).

Максимум активности сибирской язвы в Волгоградской области приходится на 1930–1959 гг. с активизацией от 178 до 213 СНП в 30 районах при наиболее высоких проявлениях неблагополучия в Урюпинском, Котельниковском, Камышинском и Жирновском районах. В 1960–1969 гг. насчитывалось 135 проявлений активности СНП в Еланском (10 СНП активных 11 раз) и Клетском (8 СНП с 12-кратной активностью). В 1970–1979 гг. активизировалось 44 СНП в 23 районах. В 1990–1999 гг. активность проявили 5 СНП, в 2000–2009 гг. и 2010–2019 гг. – по 4 пункта с выявлением в 1990–2019 гг. 13 случаев инфекции среди людей.

Установлено, что большинство СНП (525, т.е. 99,2 %) отличалось активностью более 30–50 лет тому назад, поэтому данные пункты можно считать старыми неманифестными. Новыми СНП стали по одному пункту в Суровикинском (х. Новодербеневский) и Нехаевском районах (с. Краснополье) с заболеваниями сельскохозяйственных животных (СХЖ) и людей, впервые отмеченными в 2010 и 2016 гг. соответственно (таблица).

Наиболее точные данные о количестве заболевших (павших) от сибирской язвы СХЖ и числе больных людей доступны за последние 50 лет, начиная с 1970 г. В течение этого периода в 26 районах отмечено 226 случаев заболевания СХЖ (133 головы [гол.] крупного рогатого скота [КРС], 8 гол. мелкого рогатого скота [МРС], 85 свиней), из которых пало 181 СХЖ (106 гол. КРС, 8 гол. МРС, 67 свиней). Максимум случаев инфекции среди СХЖ приходится на Старополтавский район, где в 1972–1991 гг. определено 4 гол. заболевших (4 павших) КРС и 70 заболевших (52 павших) свиней (33 % всех случаев), и Октябрьский район – 59 гол. заболевших (36 павших) КРС и 3 гол. заболевших (3 павших) МРС (27 %) в 1970–2014 г. (рис. 1).

На протяжении 1973–2014 гг. в 14 районах зафиксировано 37 случаев заболевания людей, закончившихся выздоровлением. Наибольшее количество больных сибирской язвой отмечено в Октябрьском (6 человек), Калачевском (5) и Быковском (4) районах. В пяти районах (Городищенский, Даниловский, Киквидзенский, Иловлинский, Кумылженский) проявления сибирской язвы у животных и людей на протяжении 1970–2019 г. не зарегистрированы.

Существенное влияние на снижение случаев инфекции оказало введение в 1950–1960 гг. ежегодной вакцинации против сибирской язвы восприимчивых животных, а резкий спад числа заболевших животных и людей в 1980-х гг. связан с реализацией двукратной вакцинации СХЖ практически на всей территории бывшего Советского Союза [7, 17–18].

Как видно из рис. 1, наиболее высокое количество случаев инфицирования животных и людей наблюдалось в 1970–1989 гг., когда заболели 208 СХЖ (116 гол. КРС, 7 гол. МРС, 85 свиней) и 24 человека. В последующие годы заболеваемость сибирской язвой животных и людей неуклонно снижалась. Так, в течение 20 лет (1990–2009 гг.) пали от сибирской язвы 14 гол. КРС и заболели 8 человек. В последнем десятилетии (2010–2019 гг.) обстановка по сибирской язве складывалась следующим образом: зарегистрировано 4 павших СХЖ и 5 больных людей. В 2010 г. сибиреязвенная инфекция выявлена в Суровикинском (2 чел., 1 гол. КРС), в 2011 г. – в Котельниковском (2 чел., 1 гол. МРС), в 2014 г. – в Октябрьском (1 чел., 1 гол. КРС) и Нехаевском (1 гол. КРС) районах.

Согласно материалам Комитета ветеринарии, на территории 20 районов Волгоградской области учтено 53 СЯЗ. К сожалению, сведения о характере обустройства данных захоронений отсутствуют, известно только, что они бесхозные. Это позволяет предположить частичное или полное несоответствие условий содержания 53 СЯЗ регламентированным правилам. Однако имеются некоторые дополнительные данные о сроках и кратности захоронения животных. До 1950–1960 гг. захоранивались трупы павших животных, а в последующие годы – их останки после сжигания. Так, СЯЗ, в которых первый раз захоронение животных проводилось до 1960 г., оказалось 33, при этом кратность захоронений могла достигать внушительных цифр – 60. К примеру, в р.п. Елань Еланского района с 1940 по 1979 год в одном СЯЗ захоранивались трупы животных десять раз. Естественно, что подобные СЯЗ имеют большую опасность и требуют постоянного надзора. Исследования ветеринарно-санитарного состояния СЯЗ и степени их эпизоотолого-эпидемиологической опасности в Волгоградской области будут продолжены.

Закономерность экологической приуроченности сибирской язвы является важным критерием, который

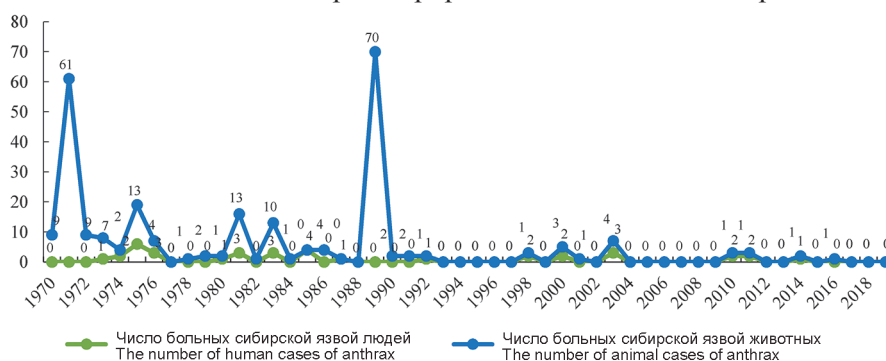


Рис. 1. Динамика заболеваемости сибирской язвой сельскохозяйственных животных и людей в Волгоградской области за период 1970–2019 гг.

Fig. 1. Dynamics of the incidence of anthrax in farm animals and population in the Volgograd Region for the period 1970–2019

необходимо учитывать в прогнозах эпизоотолого-эпидемиологической ситуации, дифференцированном планировании противосибиреязвенных мероприятий. С целью проведения сравнительного анализа неблагополучия районов Волгоградской области по сибиреязвенной инфекции в процессе эпизоотолого-эпидемиологического районирования территорий рассчитан ИЭ и применена программа ESRI-ArcGIS 10 [12–15]. В результате получены данные, позволяющие разделить районы области на четыре группы (рис. 2).

В четвертой группе с очень высоким неблагополучием (показатели ИЭ – от 0,1029 до 0,1479) выделено восемь районов (Еланский, Жирновский, Камышинский, Котельниковский, Клетский, Октябрьский, Суровикинский, Урюпинский) при наибольшей напряженности эпизоотолого-эпидемиологической ситуации в течение всего исследуемого периода (свыше 479 случаев заболевания животных). В Еланском, Камышинском, Клетском, Октябрьском районах наблюдался максимум активности инфекции с 1971 г. В 1971 г. в Октябрьском районе выявлено 50 заболевших гол. КРС, 1 гол. МРС, пали от сибирской язвы 24 СХЖ. В Урюпинском районе, имеющем самую высокую степень неблагополучия, за 1928–1994 гг. 66 существовавших СНП были активны более 34 лет с регистрацией 164 случаев заболевания сибирской язвой животных при отсутствии случаев сибиреязвенной инфекции среди людей.

Третья группа с высоким неблагополучием (показатели ИЭ – от 0,0626 до 0,0917) объединяет 11 районов, имеющих в совокупности 187 СНП, длительные периоды активности инфекции (от 13 лет в Дубовском и до 23 лет в Новониколаевском районах). Общее число заболевших животных в 1927–1989 гг. в районах третьей группы превышает 300 гол. В 1989 г. в Старополтавском районе наблюдалась вспышка сибирской язвы среди 70 свиней.

Вторая группа со средней степенью неблагополучия (показатели ИЭ – от 0,0313 до 0,0569) включает семь районов, характеризующихся более низкими значениями числа лет активности СНП, количества павших животных по сравнению с данными третьей и четвертой групп. Так, в Николаевском районе в 1936–1977 гг. сибирская язва выявлена у 57 СХЖ, а в Алексеевском и Иловлинском районах с 1930-х гг. инфекция отмечена у 33 и 38 СХЖ соответственно. На остальные четыре района (Городищенский, Калачевский, Ольховский, Среднеахтубинский) приходится свыше 50 случаев заболевания сибирской язвой животных за все время наблюдения.

К первой группе, отличающейся низкой степенью неблагополучия по сибирской язве и являющейся относительно благополучной по данной инфекции (значения ИЭ – от 0 до 0,0210), относятся семь районов со сравнительно небольшим числом СНП (39). Заболевания животных и людей отмечены в основном в 1930–1960 гг., а в 1970–1986 гг. выявлено все-

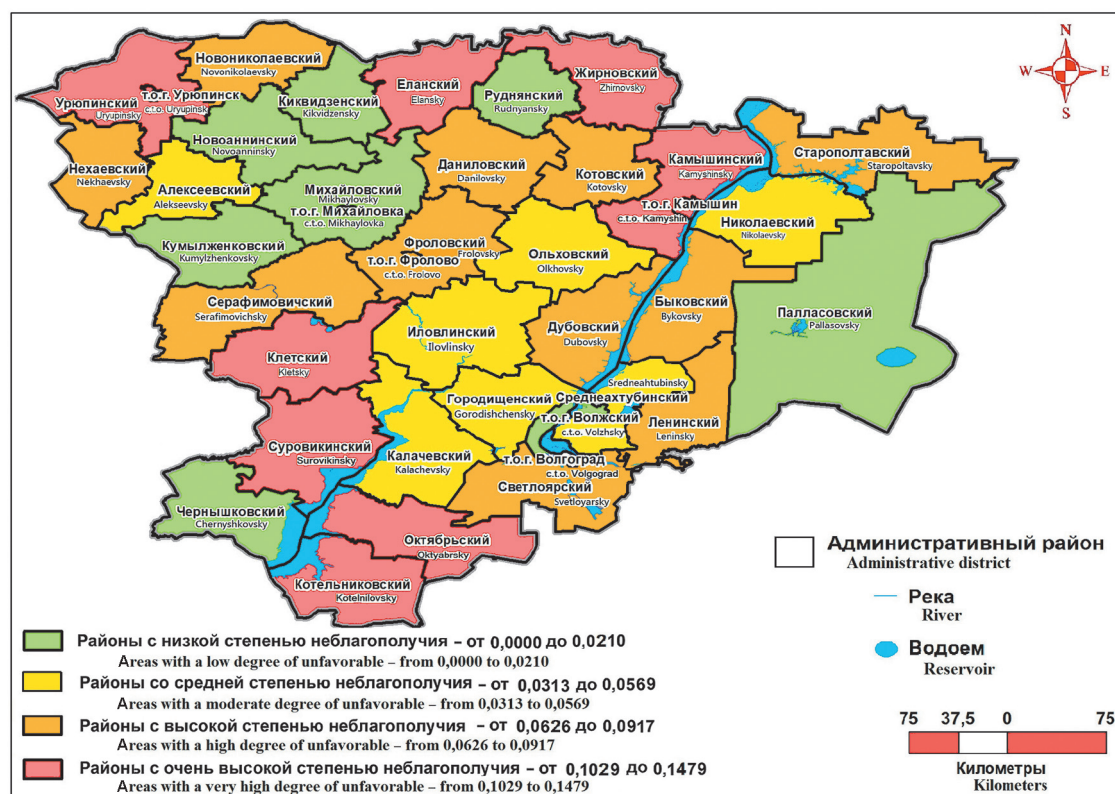


Рис. 2. Эпизоотологическое районирование по сибирской язве территории Волгоградской области

Fig. 2. Epizootological zoning of the Volgograd Region as regards anthrax

го два случая инфекции людей в Михайловском и Палласовском районах, девять случаев падежа КРС и один случай – среди МРС в четырех районах.

Волгоградская область входит в степную и полупустынную природные зоны, которые сменяются с северо-запада на юго-восток; почвы представлены черноземными, каштановыми, аллювиальными типами, песками, солонцами, солончаками [19, 20]. Известно, что активность возбудителя сибирской язвы в СНП связана с почвенно-климатическими условиями [11, 15, 21]. Наиболее длительно сибиреязвенный микроб сохраняет свою жизнеспособность в черноземах, других богатых гумусом почвах при щелочной, нейтральной реакции, высокой влажности [20]. С помощью ГИС-технологий изучена пространственно-территориальная, экологическая приуроченность СНП к различным почвенным зонам Волгоградской области [12–15, 19–22].

Как видно из рис. 3, наибольшее число СНП размещено в зонах каштановых (143 СНП, 27,03 %), аллювиальных луговых почв (114 СНП, 21,55 %), черноземов обыкновенных (89 СНП, 16,82 %) и светло-каштановых (83 СНП, 15,69 %). На темно-каштановых почвах и песках расположено 56 (10,59 %) и 20 СНП (3,78 %) соответственно. Наименьшее число пунктов (12 СНП, 2,27 %) находится на черноземах южных, а на солонцах, солончаках СНП отсутствуют. Черноземные, каштановые, темно-каштановые типы почв, занимающие более 50 % всей площади области и преобладающие в умеренно-засушливых,

сухих степях, вместе с аллювиальными луговыми почвами речных долин, пойм рек имеют достаточно высокие плодородные свойства с уровнем гумуса до 5–9 % и весьма благоприятны для вегетации, сохранения, укоренения сибиреязвенного микроба. В то же время светло-каштановые почвы на востоке области, в зоне полупустынь, наряду с солонцами и солончаками неблагоприятны для сохранения возбудителя сибирской язвы, и эти почвы можно отнести к территориям относительного благополучия по инфекции, что соответствует полученным данным эпизоотологического районирования Волгоградской области (см. рис. 2).

ГИС-технологии, применяемые при проведении настоящей работы, являлись основным инструментом изучения эпизоотолого-эпидемиологической обстановки в Волгоградской области. С помощью ГИС составлены электронные карты с привязкой всех СНП и СЯЗ по географическим координатам, дана полная характеристика районов области по числу СНП, годам проявления активности инфекции, количеству больных животных и людей. При районировании территорий, определении экологической приуроченности СНП к почвенным, ландшафтным зонам также использованы ГИС-технологии.

Таким образом, ретроспективный анализ эпизоотолого-эпидемиологической ситуации свидетельствует о том, что вся территория Волгоградской области (33 района) эндемична по сибирской язве. Эндемичность инфекции в регионе с 529 выявлен-

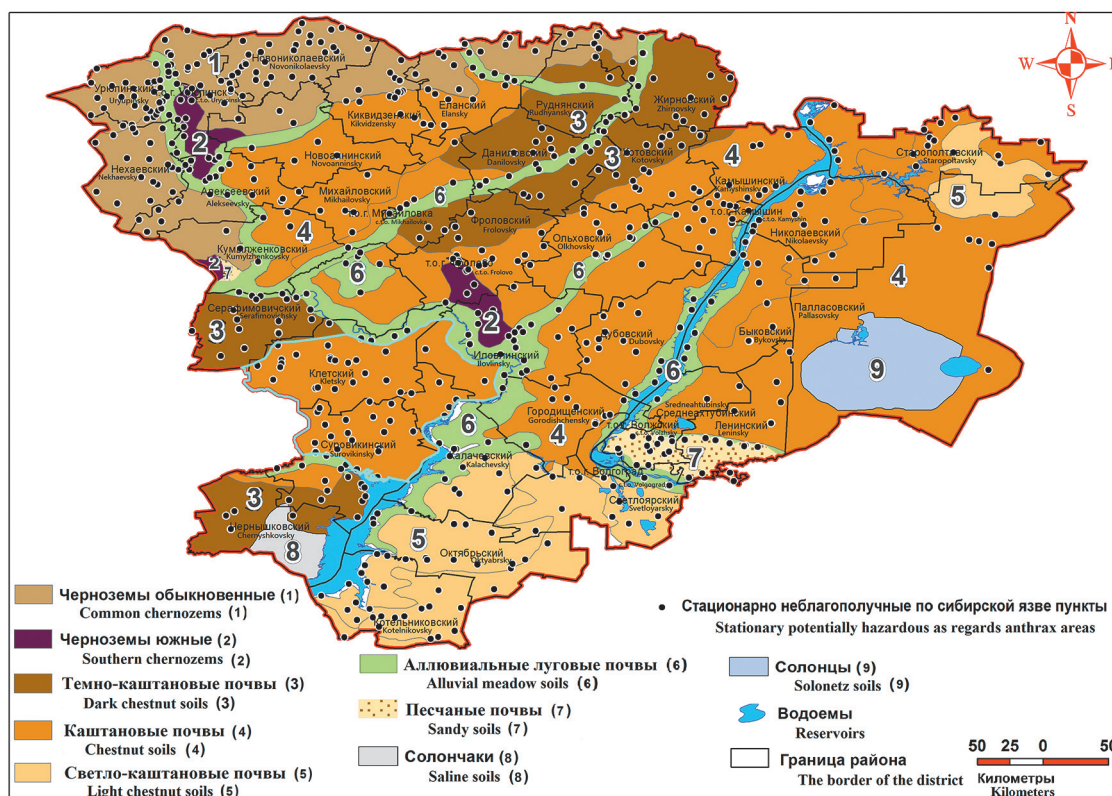


Рис. 3. Размещение стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов в различных почвенных зонах Волгоградской области

Fig. 3. Location of the stationary potentially hazardous as regards anthrax areas in the various soil zones of the Volgograd Region

ными СНП усугубляется тем обстоятельством, что в 20 районах имеются 53 бесхозных СЯЗ с неизвестным обустройством. В 1920–2019 гг. колебания числа активных СНП носили неоднородный характер, что связано с влиянием различных факторов на проявления сибирской язвы. Проведенный эпизоотолого-эпидемиологический анализ позволил осуществить эпизоотологическое районирование административных территорий Волгоградской области. По показателям ИЭ районы можно условно разделить на благополучные и неблагополучные по сибирской язве. Показано, что сибирезавенная активность на различных территориях субъекта, а также полученные значения ИЭ существенно связаны с экологической приуроченностью СНП к определенным типам почв, преобладающим ландшафтам Волгоградской области.

Для поддержания стабильного эпизоотолого-эпидемиологического благополучия по сибирской язве в регионе решающую роль имеют профилактические противосибирезавенные мероприятия, проводимые службами ветеринарии и Роспотребнадзора (иммунизация людей и восприимчивых животных в установленные сроки), а применение ГИС-технологий служит эффективным инструментом всестороннего анализа проявлений инфекции при достоверном совершенствовании существующей системы противосибирезавенного надзора, мониторинга, обеспечения контроля в принятии дифференцированных управленческих решений.

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

Работа выполнена в рамках НИР 1-1-18 «Совершенствование комплексного эпидемиологического мониторинга и профилактики сибирской язвы в Российской Федерации» (2018–2020 гг.). Номер государственной регистрации НИОКТР АААА-А18-118051890057-9.

Список литературы

1. Рязанова А.Г., Ежлова Е.Б., Пакскина Н.Д., Семенова О.В., Аксенова Л.Ю., Еременко Е.И., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Варфоломеева Н.Г., Чмеренко Д.К., Печковский Г.А., Куличенко А.Н. Ситуация по сибирской язве в 2018 г., прогноз на 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 1:98–102. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-98-102.
2. Симонова Е.Г., Раичич С.Р., Картава С.А., Локтионова М.Н., Шабейкин А.А. Проявления активности стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации в современных условиях. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 2:90–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-90-94.
3. Логвин Ф.В., Кондратенко Т.А., Водяницкая С.Ю. Сибирская язва в мире, странах СНГ и Российской Федерации (обзор литературы). *Медицинский вестник Юга России*. 2017; 8(3):17–22. DOI: 10.21886/2219-8075-2017-8-3-17-22.
4. Симонова Е.Г., Картава С.А., Раичич С.Р., Локтионова М.Н., Шабейкин А.А. Сибирская язва в Российской Федерации: совершенствование эпизоотолого-эпидемиологического надзора на современном этапе. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(2):57–62. DOI: 10.24411/2073-3046-2018-10007.
5. Попова А.Ю., Демина Ю.В., Ежлова Е.Б., Куличенко А.Н., Рязанова А.Г., Малеев В.В., Плоскирева А.А., Дятлов И.А., Тимофеев В.С., Нечепуренко Л.А., Харьков В.В. Вспышка сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 году, эпизоотологические особенности. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 4:42–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-42-46.

6. Гаврилов В.А., Тихонов И.В., Девришов Д.А. Проблемы ликвидации сибирской язвы в России. *Ветеринарная медицина*. 2011; 2:64–6.
7. Шелекова Т.В., Буянова М.Э. Сельское хозяйство Волгоградской области: современные тенденции и перспективы роста. *Региональная экономика. Юг России*. 2019; 7(2):124–34. DOI: 10.15688/re.volsu.2019.2.13.
8. Олейник О.С., Балашова Н.Н. Основные характеристики и тенденции развития животноводческой отрасли в Волгоградской области. *Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: наука и высшее профессиональное образование*. 2016; 3:295–305.
9. Алексеев В.В., редактор. Атлас эпизоотолого-эпидемиологической географии сибирской язвы в Волгоградской области (справочно-кадастровые карты и таблицы по заболеваемости людей и животных, сибирезавенным захоронениям). Волгоград; 2010. 60 с.
10. Водяницкая С.Ю., Судына Л.В., Логвин Ф.В., Водопьянов А.С., Киреев Ю.Г., Баташев В.В. ГИС-технологии в совершенствовании эпизоотологического надзора за сибирской язвой в Ростовской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2016; 21(3):152–6. DOI: 10.18821/1560-9529-2016-21-3-152-156.
11. Черкасский Б.Л., Форстман Д.В., Локтионова М.Н., Шабейкин А.А., Фаизов Т.Х. Опыт использования ГИС-технологий для изучения закономерностей пространственно-временного распределения стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2005; 6:19–23.
12. Буравцева Н.П., Антюганов С.Н., Семенко О.В., Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Куличенко А.Н., Мезенцев В.М. Эпизоотолого-эпидемиологическое районирование территории Северо-Кавказского федерального округа по степени неблагополучия по сибирской язве с использованием программы Arc GIS10. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 3:19–24. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-3-19-24.
13. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П. ГИС «Холера-Интернет» – использование современных интернет-технологий в эпизоотологической практике. *Здоровье населения и среда обитания*. 2016; 12:36–9.
14. Симонова Е.Г., Шабейкин А.А., Раичич С.Р., Локтионова М.Н., Сабурова С.А., Пяташина М.А., Ладный В.И., Гулюкин А.М. Применение геоинформационных технологий для оценки эпизоотологической и эпизоотологической ситуации по сибирской язве. *Анализ риска здоровью*. 2019; 3:74–82. DOI: 10.21668/health.risk/2019.3.09.
15. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: ИНТЕРСЭН; 2002. 384 с.
16. Черкасский Б.Л., редактор. Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации. Справочник. М.: ИНТЕРСЕН; 2005. 829 с.
17. Лухнова Л.Ю., Дерябин П.Н., Атшабар Б.Б., Мека-Меченко Т.В., Некрасова Л.Е., Суших В.Ю., Избанова У.А. История создания и основные направления совершенствования специфической профилактики сибирской язвы. *Medicine (Almaty)*. 2016; 164(2):34–45.
18. Севских Т.А. История развития вакцинопрофилактики сибирской язвы. *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук*. 2014; 8-1:328–33.
19. Рябинина Н.О. Сохранение эталонных степных экосистем и ландшафтов Волгоградской области. *Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 3: Экономика. Экология*. 2011; 1:231–8.
20. Кулик К.Н., Кретинин В.М., Рулёв А.С., Шишукнов В.М. Красная книга почв Волгоградской области. Волгоград; 2017. 224 с.
21. Родионов А.П., Артемьева Е.А., Мельникова Л.А., Косарев М.А., Иванова С.В. Особенности природной очаговости сибирской язвы и экологии *Bacillus anthracis*. *Ветеринария сегодня*. 2021; 2:151–8. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-151-158.
22. Адамович В.Л., Никонов Н.Н. Значение ландшафтно-экологических факторов в эпизоотологии сибирской язвы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1970; 6:73–9.

References

1. Ryazanova A.G., Ezhlova E.B., Pakskina N.D., Semenova O.V., Aksenova L.Yu., Eremenko E.I., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Varfolomeeva N.G., Chmerenko D.K., Pechkovsky G.A., Kulichenko A.N. [Situation on anthrax in 2018, the forecast for 2019]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (1):98–102. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-98-102.
2. Simonova E.G., Raichich S.R., Kartavaya S.A., Loktionova M.N., Shabeikin A.A. [Manifestation of activity of potentially haz-

ardous as regards anthrax areas across the Russian Federation under current conditions]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2018; (2):90–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-90-94.

3. Logvin F.V., Kondratenko T.A., Vodyanitskaya S.Yu. [Anthrax in the world, CIS and the Russian Federation (literature review)]. *Meditsinsky Vestnik Yuga Rossii* [Medical Herald of the South of Russia]. 2017; 8(3):17–22. DOI: 10.21886/2219-8075-2017-8-3-17-22.

4. Simonova E.G., Kartavaya S.A., Raichich S.R., Loktionova M.N., Shabeikin A.A. [Anthrax in the Russian Federation: improvement of epizootiological-epidemiological surveillance at the modern stage]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika* [Epidemiology and Vaccinal Prevention]. 2018; 17(2):57–62. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-2-57-62.

5. Popova A.Yu., Demina Yu.V., Ezhlova E.B., Kulichenko A.N., Ryazanova A.G., Maleev V.V., Ploskireva A.A., Dyatlov I.A., Timofeev V.S., Nepochurenko L.A., Khar'kov V.V. [Outbreak of anthrax in the Yamalo-Nenets Autonomous District in 2016, epidemiological peculiarities]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; (4):42–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-42-46.

6. Gavrilov V.A., Tikhonov I.V., Devrishov D.A. [Problems of anthrax elimination in Russia]. *Veterinarnaya Meditsina* [Veterinary Medicine]. 2011; 2:64–6.

7. Shlevkova T.V., Buyanova M.E. [The agriculture of the Volgograd Region: modern trends and prospects for growth]. *Regional'naya Ekonomika. Yug Rossii*. [Regional Economy. South of Russia]. 2019; 7(2):124–34. DOI: 10.15688/re.volsu.2019.2.13.

8. Oleynik O.S., Balashova N.N. [Main characteristics and development trends of the livestock industry in the Volgograd Region]. *Izvestiya Nizhnevolzhskogo Agrouniversitetskogo Kompleksa: Nauka i Vysshee Professional'noe Obrazovanie* [News of the Lower Volga Agro-University Complex: Science and Higher Professional Education]. 2016; 3:295–305.

9. Alekseev V.V., editor. [Atlas of the Epizootiological and Epidemiological Geography of Anthrax in the Volgograd Region (Reference Cadastral Maps and Tables on the Human and Animal Incidence, and Anthrax Burials)]. Volgograd; 2010. 60 p.

10. Vodyanitskaya S.Yu., Sudina L.V., Logvin F.V., Vodop'yanov A.S., Kireev Yu.G., Batashev V.V. [GIS-technologies in the advancement of epidemiological surveillance over anthrax in the Rostov Region]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni* [Epidemiology and Infectious Diseases]. 2016; 21(3):152–6. DOI: 10.18821/1560-9529-2016-21-3-152-156.

11. Cherkassky B.L., Forstman D.V., Loktionova M.N. [Experience in using GIS technologies to study the patterns of the spatial-temporal distribution of stationary anthrax-unfavorable sites]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni* [Epidemiology and Infectious Diseases]. 2005; 6:19–23.

12. Buravtseva N.P., Antyuganov S.N., Semenko O.V., Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Kulichenko A.N., Mezentsev V.M. [Epizootiological and epidemiological zoning of the territory of North Caucasus Federal District by a degree of non-welfare by anthrax using ArcGIS 10 program]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2016; 3:19–24. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-3-19-24.

13. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin B.N., Oleynikov I.P. [GIS “Cholera-Internet” – the use of modern internet technologies in epidemiological practice]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya* [Public Health and Life Environment]. 2016; 12(285):36–9.

14. Simonova E.G., Shabeikin A.A., Raichich S.R., Loktionova M.N., Saburova S.A., Patyashina M.A., Ladny V.I., Gulyukin A.M. [Application of geo-information technologies for the assessment of epizootiological and epidemiological situation on anthrax]. *Analiz Riska Zdorov'yu* [Health Risk Analysis]. 2019; 3:74–82. DOI: 10.21668/health.risk/2019.3.09.

15. Cherkassky B.L. Epidemiology and Prevention of Anthrax. Moscow: “INTERSEN”; 2002. 384 p.

16. Cherkassky B.L., editor. [Cadastre of Stationary Potentially Hazardous as Regards Anthrax Areas in the Russian Federation. Reference Book]. Moscow: “INTERSEN”; 2005. 829 p.

17. Lukhnova L.Yu., Deryabin P.N., Atshabar B.B., Meka-Mechenko T.V., Nekrasova L.E., Suschikh V.Yu., Izbanova U.A. [History of creation and main areas of improvement of specific prevention of anthrax]. *Medicine (Almaty)*. 2016; 164(2):34–45.

18. Sevskikh T.A. [History of the preventive vaccination against anthrax]. *Aktual'nye Problemy Gumanitarnykh i Estestvennykh Nauk* [Relevant Issues of Humanitarian and Natural Sciences]. 2014; 8:328–33.

19. Ryabinina N.O. [Preservation of reference steppe ecosystems and landscapes of the Volgograd Region]. *Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya 3: Ekonomika. Ekologiya* [Journal of the Volgograd State University. Series 3: Economics. Ecology]. 2011; 18(1):231–8.

20. Kulik K.N., Kretinin V.M., Rulev A.S., Shishkunov V.M. [Red Book of Soils of the Volgograd Region]. Volgograd; 2017. 224 p.

21. Rodionov A.P., Artem'eva E.A., Mel'nikova L.A., Kosarev M.A., Ivanova S.V. [Features of anthrax natural focality and *Bacillus anthracis* ecology]. *Veterinariya Segodnya* [Veterinary Science Today]. 2021; 2:151–8. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-151-158.

22. Adamovich V.L., Nikonov N.N. [The significance of landscape and environmental factors in the epizootiology of anthrax]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 1970; 6:73–9.

Authors:

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

Logvin F.V. Rostov State Medical University. 29, Nakhichevsky Lane, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation. E-mail: atlz3@mail.ru.

Perekhozheva S.V. Rospotrebnadzor Administration in the Volgograd Region. 50b, V.I. Lenin Avenue, Volgograd, 400005, Russian Federation, E-mail: info@34.rospotrebnadzor.ru.

Об авторах:

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

Логвин Ф.В. Ростовский государственный медицинский университет. Российская Федерация, 344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: atlz3@mail.ru.

Перехожеева С.В. Управление Роспотребнадзора по Волгоградской области. Российская Федерация, 400005, Волгоград, пр. им. В.И. Ленина, 50б. E-mail: info@34.rospotrebnadzor.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-120-127

УДК 616.932:616-07

В.Н. Савельев¹, А.Н. Куличенко¹, И.В. Савельева¹, Д.А. Ковалев¹, Т.В. Таран¹, Е.И. Подопригра¹,
В.В. Сосунов², Т.В. Радаева²

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТИПИЧНЫХ И ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ВАРИАНТОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ БИОВАРА ЭЛЬ ТОР МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

¹ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация;

²ООО «ДНК-СИНТЕЗ», Москва, Российская Федерация

Цель работы – анализ и оценка результатов ПЦР-тест-системы «Гены *V. cholerae* вариант *ctxB-rtxC*, FL» для идентификации *Vibrio cholerae* O1 с дифференциацией на типичные токсигенные и генетически измененные варианты в мультиплексном формате с гибридационно-флуоресцентным методом учета результатов в режиме реального времени. **Материалы и методы.** Для достижения указанной цели в работе представлен набор реагентов ПЦР-тест-системы «Гены *V. cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL», а также способ осуществления идентификации *V. cholerae* O1 с дифференциацией на типичные токсигенные и генетически измененные варианты. Изучены специфичность, специфическая активность и чувствительность разработанной тест-системы на 35 штаммах *V. cholerae* O1, 6 штаммах *V. cholerae* non O1, 5 гетерологичных штаммах (*Shigella zonnei* – 2 штамма, по одному штамму *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Escherichia coli*). **Результаты и обсуждение.** Набор реагентов ПЦР-тест-системы «Гены *V. cholerae* вариант *ctxB-rtxC*, FL» выявляет в геноме токсигенных *V. cholerae* O1 фрагменты ДНК генов *ctxB^{Cl}*, *ctxB^{El}*, *rtxC* (обладает специфической активностью, аналитическая чувствительность $1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл) и не обнаруживает данные гены у нетоксигенных *V. cholerae* O1 и non O1, а также у гетерологичных штаммов микроорганизмов (показана специфичность 100 %). На ПЦР-тест-систему «Гены *V. cholerae* вариант *ctxB-rtxC*, FL» получен патент РФ № 2732448, опубл. 24.08.2020, бюл. № 24. ПЦР-тест-система «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL» может быть использована для повышения эффективности системы эпидемиологического надзора за холерой и проведения обоснованного объема противоэпидемических мероприятий в случае ее завоза на территорию Российской Федерации.

Ключевые слова: типичные токсигенные и генетически измененные варианты холерного вибриона биовара Эль Тор, ПЦР-тест-система для идентификации возбудителя холеры.

Корреспондирующий автор: Савельев Вилорий Николаевич, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Савельев В.Н., Куличенко А.Н., Савельева И.В., Ковалев Д.А., Таран Т.В., Подопригра Е.И., Сосунов В.В., Радаева Т.В. Тест-система для идентификации типичных и генетически измененных вариантов холерных вибрионов биовара Эль Тор методом ПЦР в режиме реального времени. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 4:120–127. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-120-127

Поступила 08.04.2021. Отправлена на доработку 29.04.2021. Принята к публ. 19.05.2021.

V.N. Savel'ev¹, A.N. Kulichenko¹, I.V. Savel'eva¹, D.A. Kovalev¹, T.V. Taran¹, E.I. Podoprigha¹,
V.V. Sosunov², T.V. Radaeva²

Test-System for Identification of Typical and Genetically Altered Variants of Cholera Vibrios, Biovar El Tor, Using Real-Time PCR

¹Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation;

²“DNK-SINTEZ” LLC, Moscow, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to analyze and assess the results of using PCR test-system “*V. cholerae* variant *ctxB-rtxC* FL genes” for identification of *Vibrio cholerae* O1 with differentiation between typical toxigenic and genetically modified variants in a multiplex format with a real-time hybridization-fluorescent recording of results. **Materials and methods.** To achieve this goal, a set of reagents for the PCR test-system “*V. cholerae* O1 variant *ctxB-rtxC* FL genes”, as well as a method for identifying *V. cholerae* O1 with differentiation between typical toxigenic and genetically altered variants were utilized. The specificity, specific activity and sensitivity of the developed test-system by the example of 35 *V. cholerae* O1 strains, 6 *V. cholerae* non-O1 strains, 5 heterologous strains (*Shigella zonnei* – 2 strains, one *Salmonella typhimurium* strain, *S. enteritidis*, *Escherichia coli*) were investigated. **Results and discussion.** The panel of reagents for the PCR test system “*V. cholerae* variant *ctxB-rtxC* FL genes” detects DNA fragments of the *ctxB^{Cl}*, *ctxB^{El}*, *rtxC* genes in the genome of toxigenic *V. cholerae* O1 (has specific activity, analytical sensitivity $1 \cdot 10^3$ GE/ml) and does not detect these genes in non-toxicogenic *V. cholerae* O1 and non-O1, as well as in heterologous strains of microorganisms (100 % specificity). RF Patent No. 2732448 was granted for the PCR test-system “*V. cholerae* variant *ctxB-rtxC* FL genes”. It can be used to increase the efficiency of the epidemiological surveillance system and to carry out a justified scope of anti-epidemic measures in the event of cholera importation into the territory of the Russian Federation.

Key words: typical toxigenic and genetically modified variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor, PCR test-system for identification of the causative agent of cholera.

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

Corresponding author: Vilory N. Savel'ev, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Citation: Savel'ev V.N., Kulichenko A.N., Savel'eva I.V., Kovalev D.A., Taran T.V., Podoprigora E.I., Sosunov V.V., Radaeva T.V. Test-System for Identification of Typical and Genetically Altered Variants of Cholera Vibrios, Biovar El Tor, Using Real-Time PCR. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:120–127. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-120-127

Received 08.04.2021. Revised 29.04.2021. Accepted 19.05.2021.

Savel'ev V.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6458-3725>

Kulichenko A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0000-9362-39>

Savel'eva I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1254-2259>

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

Taran T.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8070-0706>

Podoprigora E.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4549-9701>

Типичные токсигенные холерные вибрионы биовара Эль Тор (*Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor, Hly[–], ctxA⁺) за счет присутствия в геноме дополнительных блоков генов, обеспечивающих высокий уровень адаптации к меняющимся условиям окружающей среды (островов патогенности (VPI-I, II) и пандемичности (VSP-I, II)) [1–3], явились этиологическим фактором холеры в Азии (1961–1969 гг.), Азии, Африке, Европе, США, Океании (1970–1980 гг.), Азии, Африке, Европе, США, Океании, Австралии (1981–1990 гг.) [4–11].

В начале 90-х гг. прошлого столетия появились штаммы холерного вибриона O1 серологической группы с фено- и генотипическими признаками классического и Эль Тор биоваров, получивших название «генетически измененные» (геноварианты) или «гибридные» варианты холерных вибрионов биовара Эль Тор [12, 13], и они являются доминантными этиологическими агентами современного этапа развития седьмой пандемии холеры Эль Тор, начавшейся в 1990-е гг., а в первые два десятилетия XXI в. получили глобальное распространение.

Эволюционные преобразования типичного токсигенного биовара Эль Тор в гибридный вариант сопровождались изменениями структуры генов коровой области профагов CTX_φ и RS1_φ. В результате горизонтального переноса генов образовались генотипы с различными комбинациями генов патогенности типичного Эль Тор и классического биовара. При этом геномы названных вариантов биовара Эль Тор обязательно содержат ген ctxB^{Cl}, кодирующий биосинтез энтеротоксина классического типа (СТ1) [14]. Вместе с тем эволюционные преобразования в гибридный вариант не затронули гены «домашнего хозяйства», в частности ген rtxC, специфичный для типичного токсигенного биовара Эль Тор. При этом в реакции полимеразной цепной реакции типичные токсигенные штаммы биовара Эль Тор образуют ампликоны к генам ctxB^{El} и rtxC, а генетически измененные варианты биовара Эль Тор образуют ампликоны к генам ctxB^{Cl} и rtxC.

Учитывая генетические особенности гибридных вариантов Эль Тор, специалисты РосНИПЧИ «Микроб» разработали «Набор реагентов для идентификации токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 классического и Эль Тор биоваров и дифференциации Эль Тор вибрионов на типичные и измененные методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с электрофорезным учетом результатов (Ген *Vibrio cholerae* вариант ctxB-РЭФ)» [15, 16].

Цель работы – анализ и оценка результатов ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант

ctxB-rtxC, FL» для идентификации *V. cholerae* O1 с дифференциацией на типичные токсигенные и генетически измененные варианты в мультиплексном формате с гибридизационно-флуоресцентным методом учета результатов в режиме реального времени.

Материалы и методы

В работе использовали набор реагентов ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант ctxB-rtxC, FL», предназначенный для идентификации *V. cholerae* O1 с определением биовара и дифференциацией вибрионов биовара Эль Тор на типичные штаммы и генетически измененные (гибридные) варианты методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов, состоящий из следующих ингредиентов (табл. 1).

Для изучения специфичности, специфической активности и чувствительности разработанной тест-системы использованы гомологичные штаммы: штаммы *V. cholerae* O1 стандартного образца ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» СО 002-9388-2010 «Набор штаммов для контроля качества МИБП для диагностики холеры» – 35 штаммов, *V. cholerae* non O1 – 6 штаммов, гетерологичные штаммы – 5 штаммов (*Shigella zonnei* (2 штамма), *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Escherichia coli*).

Штаммы указанных микроорганизмов получены из коллекции патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института, где холерные вибрионы хранились в 0,4 % агаре Хоттингера при температуре 20–25 °С, а шигеллы, сальмонеллы и кишечные палочки – в 0,4 % агаре Хоттингера при 4–6 °С.

Подготовку проб проводили согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Выделение ДНК осуществляли с использованием комплекта реагентов для экстракции ДНК «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия).

Аллельспецифические праймеры для амплификации смеси генов F+R ctxB (ctxB^{Cl}+ctxB^{El}) и rtxC методом полимеразной цепной реакции в мультиплексном формате с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на амплификаторе Rotor Gene Q5 синтезировали в ООО «ДНК-Синтез». Полимеразную цепную реакцию двух реакционных смесей различ-

Таблица 1 / Table 1

Состав набора реагентов ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC, FL*»
Composition of the set of reagents for the PCR test system “*Vibrio cholerae* O1 variant *ctxB-rtxC, FL*”

Компонент Component	Описание Description	Объем, мкл Volume, µl	Кол-во (пробирка) Qty (test tube)
ПЦР-смесь 1: (F+R) праймеры <i>ctxB^{Cl}</i> (10 мкМ) GREEN <i>ctxB^{El}</i> (10 мкМ) YELLOW PCR mixture 1: (F+R) <i>ctxB^{Cl}</i> primers (10 µM) GREEN <i>ctxB^{El}</i> (10 µM) YELLOW	Лиофильно высушенный порошок, при растворении – прозрачная бесцветная жидкость, содержащая праймеры к генам <i>B1</i> и <i>B3</i> Freeze-dried powder, when dissolved – a clear colorless liquid containing primers for <i>B1</i> and <i>B3</i> genes	130	1
Зонд G-FAM (10 мкМ) GREEN G-FAM probe (10 µM) GREEN	Лиофильно высушенный порошок. Выявляет ген <i>B1</i> на канале Green Freeze-dried powder. Identifies <i>B1</i> gene on the Green channel	55	1
Зонд – A-VIC (10 мкМ) YELLOW Probe – A-VIC (10 µM) YELLOW	Лиофильно высушенный порошок. Выявляет ген <i>B3</i> на канале Yellow Freeze-dried powder. Identifies the <i>B3</i> gene on the Yellow channel	55	1
ПЦР-смесь 2: (F+R) праймеры <i>rtxC</i> (10 мкМ) ORANGE PCR-mixture 2: (F+R) <i>rtxC</i> primers (10µM) ORANGE	Лиофильно высушенный порошок, при растворении – прозрачная бесцветная жидкость, содержащая праймеры к гену <i>rtxC</i> Freeze-dried powder, when dissolved – a clear colorless liquid containing primers to the <i>rtxC</i> gene	130	1
Зонд для выявления гена <i>rtxC</i> на канале ORANGE Probe for detecting <i>rtxC</i> gene on the ORANGE channel	Лиофильно высушенный порошок. Выявляет ген <i>rtxC</i> на канале ORANGE Freeze-dried powder. Identifies the <i>rtxC</i> gene on the ORANGE channel	55	1
Смесь дНТП 10x (5 мМ) dNTP Mixture 10x (5 mM)	Прозрачная бесцветная жидкость Transparent colorless liquid	55	1
10x буфер для TaqPol+MgCl ₂ 10x Buffer for TaqPol+MgCl ₂	Прозрачная бесцветная жидкость Transparent colorless liquid	130	1
Taq-полимераза (5 ед/мкл) Taq polymerase (5 units/µl)	Прозрачная бесцветная жидкость Transparent colorless liquid	30	1
К – (H ₂ O или РНК-элюент) K – (H ₂ O or RNA eluent)	Вода очищенная – прозрачная бесцветная жидкость Purified water – transparent colorless liquid	1200	1
ПКО+Class (ДНК, 569B) PCS+Class (DNA, 569B)	Прозрачная бесцветная жидкость – водный раствор ДНК <i>V. cholerae</i> O1 классического биовара Transparent colorless liquid – aqueous solution of <i>V. cholerae</i> O1 DNA of classic biovar	55	1
ПКО+El Tor (ДНК, 484Ст) PCS+El Tor (DNA, 484St)	Прозрачная бесцветная жидкость – водный раствор ДНК <i>V. cholerae</i> O1 биовара Эль Тор Transparent colorless liquid – aqueous solution of <i>V. cholerae</i> O1 biovar El Tor	55	1

Примечание: набор реагентов «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC, FL*» рассчитан на 50 определений с учетом положительных и отрицательных контролей. ПКО – положительный контрольный образец.

Note: the set of reagents “*Vibrio cholerae* O1 variant *ctxB-rtxC FL* genes” is designed for 50 runs, taking into account positive and negative controls. PCS – positive control sample.

ного состава с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени проводили в объеме 25 мкл (табл. 2).

Режим амплификации: 1 цикл 95 °C – 3 мин; 40 циклов 95 °C – 20 с; 57 °C – 30 с; 72 °C – 20 с. Накопление продукта амплификации только с зондом, специфичного к гену *ctxB^{Cl}* (G-FAM) в канале Green, свидетельствует о наличии в пробе *ctxB^{Cl}* (B1). Накопление продукта амплификации только с зондом, специфичного к гену *ctxB^{El}* (A-VIC) в канале HEX/VIC (Yellow), – о наличии в пробе гена *ctxB^{El}* (B3).

Накопление продукта амплификации с двумя зондами одновременно (в двух каналах) свидетельствует о наличии в пробе ДНК двух генов одновременно. Накопление продукта амплификации только с зондом ROX, специфичного к гену *rtxC* в канале Orange, свидетельствует о наличии в пробе ДНК гена *rtxC*.

Анализ и интерпретация результатов:

а) анализ результатов амплификации ДНК исследуемых штаммов микроорганизмов с ПЦР-смесью № 1: анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Таблица 2 / Table 2

Состав реакционных смесей
The composition of the reaction mixtures

Смесь № 1 Mix No. 1	Смесь № 2 Mix No. 2
10x буфер для TaqPol, 2,5 мкл 10x TaqPol buffer, 2.5 µl	10x буфер для TaqPol, 2,5 мкл 10x TaqPol buffer, 2.5 µl
MgCl ₂ (50 мкМ), 2,0 мкл MgCl ₂ (50 µM), 2.0 µl	MgCl ₂ (50 мкМ), 2,0 мкл MgCl ₂ (50 µM), 2.0 µl
(F+R <i>ctxB</i>) праймеры (10 мкМ), 2,5 мкл (F+R <i>ctxB</i>) primers (10 µM), 2.5 µl	(F+R <i>rtxC</i>) праймеры (10 мкМ), 2,5 мкл (F+R <i>rtxC</i>) primers (10 µM), 2.5 µl
Зонд G-FAM (10 мкМ), Green, 1 мкл G-FAM probe (10 µM), Green, 1 µl	Зонд на <i>rtxC</i> (10 мкМ), Orange, 1 мкл Probe for <i>rtxC</i> (10 µM), Orange, 1 µl
Зонд A-VIC (10 мкМ), Yellow, 1 мкл Probe A-VIC (10 µM), Yellow, 1 µl	
Смесь dNTPs (5 мкМ), 4 мкл dNTPs mixture (5 µM), 4 µl	Смесь dNTPs (5 мкМ), 4 мкл dNTPs mixture (5 µM), 4 µl
TaqPol (5 ед/мкл), 1 мкл TaqPol (5 U/µl), 1 µl	TaqPol (5 ед/мкл), 1 мкл TaqPol (5 U/µl), 1 µl
Вода до 25 мкл Water up to 25 µl	Вода до 25 мкл Water up to 25 µl
Контроли: Controls:	Контроли: Controls:
К – (H ₂ O) – отрицательный, 2,0 мкл K – (H ₂ O) – negative control, 2.0 µl	К – (H ₂ O) – отрицательный, 2,0 мкл K – (H ₂ O) – negative control, 2.0 µl
ПКО+Эль Тор: ДНК <i>V. cholerae</i> El Tor PCS +El Tor: DNA <i>V. cholerae</i> El Tor	ПКО+Эль Тор: ДНК <i>V. cholerae</i> El Tor PKO+El Tor: DNA <i>V. cholerae</i> El Tor
484Ст (10 нг/мкл), 2 мкл 484St (10 ng/µl), 2 µl	484Ст (10 нг/мкл), 2 мкл 484St (10 ng/µl), 2 µl
ПКО+Classical: ДНК <i>V. cholerae</i> Classical PCS +Classical: DNA <i>V. cholerae</i> Classical	ПКО+Classical: ДНК <i>V. cholerae</i> Classical PKO+Classical: DNA <i>V. cholerae</i> Classical
569В (10 нг/мкл), 2 мкл 569B (10 ng/µl), 2 µl	569В (10 нг/мкл), 2 мкл 569B (10 ng/µl), 2 µl
ДНК (10 нг/мкл) изучаемая, 2 мкл DNA (10 ng/µl) studied, 2 µl	ДНК (10 нг/мкл) изучаемая, 2 мкл DNA (10 ng/µl) studied, 2 µl

- по каналу для флуорофора G-FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена *ctxB^{Cl}* (B1) на канале Green;

- по каналу для флуорофора A-VIC регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена *ctxB^{El}* (B3) на канале Yellow;

б) анализ результатов амплификации ДНК исследуемых штаммов микроорганизмов с ПЦР-смесью № 2: по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена *rtxC* на канале Orange.

Уровень пороговой линии (порог) на всех каналах учета – 0,05. Величина порогового цикла для положительных проб составила: Ct не ≥25. Корректировка уклона выявленных кривых обязательна, процент устранения выбросов – 15–20 %. Амплификацию осуществляли на приборе RotorGeneQ 5plex (QiaGen, ФРГ).

Результаты и обсуждение

Результаты ПЦР-анализа ДНК штаммов *V. cholerae* при использовании тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* вариант *ctxB-rtxC*, FL» представлены в табл. 3 и на рисунке.

Примеры результатов ПЦР-анализа ДНК генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 представлены на рисунке.

Таким образом, набор реагентов ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* вариант *ctxB-rtxC*, FL» выявляет в геноме токсигенных *V. cholerae* O1 фрагменты ДНК генов *ctxB^{Cl}*, *ctxB^{El}*, *rtxC* (обладает специфической активностью) и не обнаруживает данные гены у нетоксигенных *V. cholerae* O1 и non O1, а также у гетерологичных штаммов микроорганизмов: *S. zonnei* 20, 76; *S. typhimurium* 160; *S. enteritidis* 165; *E. coli* 406-1 (обладает специфичностью).

Образцы набора реагентов ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL» для идентификации штаммов *V. cholerae* O1 с определе-

Таблица 3 / Table 3

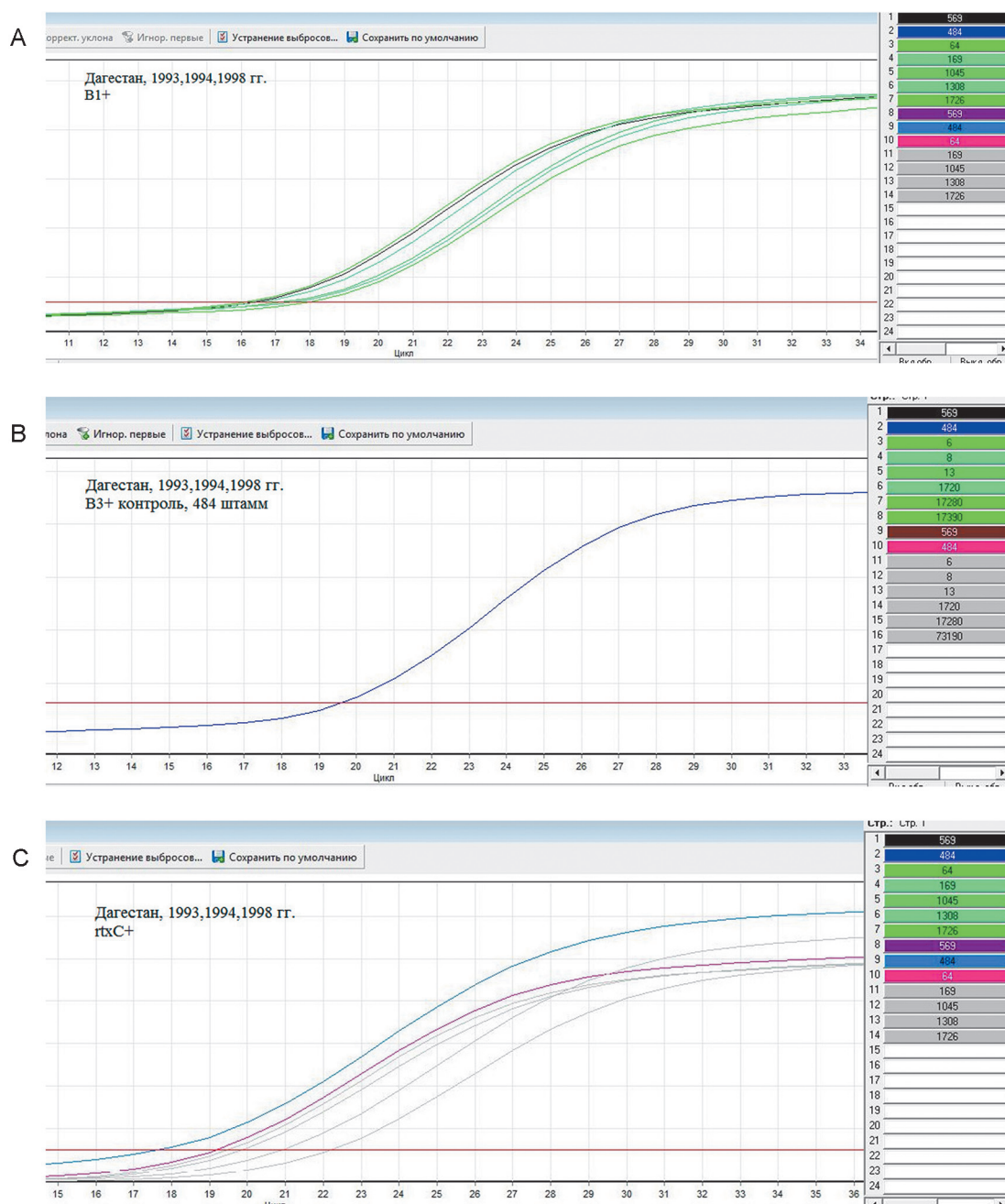
Протокол учета результатов ПЦР-анализа ДНК штаммов *V. cholerae* O1, non O1/139 и гетерологичных при использовании тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* вариант *ctxB-rtxC*, FL»

Protocol for recording the results of PCR assay of *V. cholerae* O1, non O1/139 and heterologous strain DNA, using the test system “*Vibrio cholerae* variant *ctxB-rtxC* FL genes”

ДНК штаммов <i>V. cholerae</i> O1 DNA of <i>V. cholerae</i> O1 strains	ПЦР-смеси праймеров № 1, 2 <i>V. cholerae</i> O1 PCR primer mixtures No. 1, 2 <i>V. cholerae</i> O1			Результат / Result (Биовар / Biovar)
	Каналы учета выявляемых генов в режиме реального времени Channels for registering the detected genes in real-time mode			
	Green: (<i>B1</i>)	Yellow: (<i>B3</i>)	Orange: <i>rtxC</i>	
K – (H ₂ O) / K – (H ₂ O)	–	–	–	–
ПКО+Class / PCS + Class	+	–	–	БК / BC
ПКО+El Tor / PCS + El Tor	–	+	+	БЭТ / BET
ДНК Эль Тор / DNA El Tor	+	–	+	ГИЭ / GME
Дагестан, 1993 г. / Dagestan, 1993				
1. <i>V. cholerae</i> O1, 64	+	–	+	ГИЭ / GME
2. <i>V. cholerae</i> O1, 169	+	–	+	ГИЭ / GME
3. <i>V. cholerae</i> O1, 1045	+	–	+	ГИЭ / GME
4. <i>V. cholerae</i> O1, 1308	+	–	+	ГИЭ / GME
5. <i>V. cholerae</i> O1, 1726	+	–	+	ГИЭ / GME
Дагестан, 1994 г. / Dagestan, 1994				
6. <i>V. cholerae</i> O1, 489	+	–	+	ГИЭ / GME
7. <i>V. cholerae</i> O1, 549	+	–	+	ГИЭ / GME
8. <i>V. cholerae</i> O1, 1095	+	–	+	ГИЭ / GME
9. <i>V. cholerae</i> O1, 1105	+	–	+	ГИЭ / GME
10. <i>V. cholerae</i> O1, 1120	+	–	+	ГИЭ / GME
11. <i>V. cholerae</i> , 1641	+	–	+	ГИЭ / GME
Дагестан, 1998 г. / Dagestan, 1998				
12 <i>V. cholerae</i> O1, 6K	+	–	+	ГИЭ / GME
13. <i>V. cholerae</i> O1, 8K	+	–	+	ГИЭ / GME
14. <i>V. cholerae</i> O1, 13K	+	–	+	ГИЭ / GME
15. <i>V. cholerae</i> 1720к	+	–	+	ГИЭ / GME
16. <i>V. cholerae</i> 1, 17280	+	–	+	ГИЭ / GME
17. <i>V. cholerae</i> O1, 17390	+	–	+	ГИЭ / GME
Украина, Мариуполь (1994, 1995, 1998 гг.) / Ukraine, Mariupol (1994, 1995, 1998)				
18. <i>V. cholerae</i> O1, 12K	+	–	+	ГИЭ / GME
19. <i>V. cholerae</i> O1, 31K	+	–	+	ГИЭ / GME
20. <i>V. cholerae</i> O1, 39K	+	–	+	ГИЭ / GME
21. <i>V. cholerae</i> O1, 43K	+	–	+	ГИЭ / GME
22. <i>V. cholerae</i> O1, 56K	+	–	+	ГИЭ / GME
23. <i>V. cholerae</i> O1, 80K	+	–	+	ГИЭ / GME
Азербайджан, 1985 г.; Ставрополь, 1990 г. / Azerbaijan, 1985; Stavropol, 1990				
24. <i>V. cholerae</i> O1, 350Аз	–	+	+	БЭТ / BET
25. <i>V. cholerae</i> O1, 351Аз	–	+	+	БЭТ / BET
26. <i>V. cholerae</i> O1, 363Аз	–	+	+	БЭТ / BET
27. <i>V. cholerae</i> O1, 431Ст	–	+	+	БЭТ / BET
28. <i>V. cholerae</i> O1, 454Ст	–	+	+	БЭТ / BET
29. <i>V. cholerae</i> O1, 477Ст	–	+	+	БЭТ / BET
Сочи, 2015 г. / Sochi, 2015 (sampling with traps)				
30. <i>V. cholerae</i> O1, 3 л	–	–	+	–
31. <i>V. cholerae</i> O1, 5 л	–	–	+	–
32. <i>V. cholerae</i> O1, 7 л	–	–	+	–
33. <i>V. cholerae</i> O1, 548 л	–	–	+	–
34. <i>V. cholerae</i> O1, 647 л	–	+	+	БЭТ / BET
35. <i>V. cholerae</i> O1, 1013 л	–	–	+	–
Азербайджан, <i>V. cholerae</i> не O1 / Azerbaijan, <i>V. cholerae</i> non-O1				
36. <i>V. cholerae</i> не O1, 1775Аз	–	–	–	–
37. <i>V. cholerae</i> не O1, 2286Аз	–	–	–	–
38. <i>V. cholerae</i> не O1, 2603Аз	–	–	–	–
39. <i>V. cholerae</i> не O1, 5278Аз	–	–	–	–
40. <i>V. cholerae</i> не O1, 7007Аз	–	–	–	–
41. <i>V. cholerae</i> не O1, 161–168, коллекция Саказики	–	–	–	–
Гетерологичные штаммы / Heterologous strains				
42. <i>S. zonnei</i> , 20	–	–	–	–
43. <i>S. zonnei</i> , 76	–	–	–	–
44. <i>S. enteritidis</i> , 160	–	–	–	–
45. <i>E. coli</i> , 406-1	–	–	–	–
46. <i>S. typhimurium</i> , 165	–	–	–	–

Примечание: БК – биовар классический; БЭТ – биовар Эль Тор типичный; ГИЭ – генетически измененный биовар Эль Тор.

Note: BC – classic biovar; BET – biovar El Tor typical; GME – genetically modified El Tor.



Типичные кривые амплификации при анализе ДНК штаммов *V. cholerae* O1, выделенных в Республике Дагестан в 1993, 1994, 1998 гг. Канал Green (A); канал Yellow (B); канал Orange (C)

Typical amplification curves in the analysis of DNA of *V. cholerae* O1 strains isolated in the Republic of Dagestan in 1993, 1994, 1998. Green channel (A); Yellow channel (B); Orange channel (C)

нием биовара и дифференциацией биовара Эль Тор на типичные токсигенные и генетически измененные (гибридные) варианты методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов (серии 1–18 и 2–18) соответствуют требованиям ТУ 21.10.60-52-018977080–2019.

ПЦР-тест-система «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL» позволяет выявлять генетически измененные штаммы холерных вибрионов биовара Эль Тор и соответствует результатам, полученным с помощью ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rstR-rstC*, РЭФ» (опытный

образец, Ставропольский противочумный институт) и ПЦР-тест-системы «Ген *V. cholerae* вариант *ctxB*-РЭФ», предназначенной для идентификации токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы, определения биовара выделенного штамма, дифференциации Эль Тор вибрионов на типичные штаммы и генетически измененные варианты методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (производство РосНИПЧИ «Микроб»).

Основное преимущество разработанной ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL» при сравнении с указанными выше

заключается в том, что идентификация штаммов *V. cholerae* O1 с определением биовара и дифференциацией биовара Эль Тор на типичные токсигенные и генетически измененные (гибридные) варианты осуществляется методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. Воспроизводимость результатов, получаемых с помощью данной ПЦР-тест-системы, составляет 100 %. Чувствительность тест-системы составила 10^3 ГЭ/мл.

Представленная ПЦР тест-система «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL» может быть использована для повышения эффективности системы эпидемиологического надзора за холерой и принятия обоснованного решения по объему противоэпидемических мероприятий в случае ее завоза на территорию Российской Федерации.

На ПЦР-тест-систему «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL» получен патент РФ на изобретение № 2732448 (опубл. 24.08.2020, бюл. № 24) [17].

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

Список литературы

1. De Haan L., Hirst T.R. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms. *Mol. Membr. Biol.* 2004; 21(2):77–92. DOI: 10.1080/09687680410001663267.
2. Dziejman M.E., Balon D., Boyd C.M., Fraser J.F., Heidelberg J.J., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and handemic disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002; 99(3):1556–61. DOI: 0.1073/pnas.042667999.
3. Pradhan S., Baidya A.K., Ghosh A., Paul K., Chowdhury R. The El Tor biotype of *Vibrio cholerae* exhibits *Vibrio cholerae* a growth advantage in the stationary phase in mixt cultures with the classical biotype. *J. Bacteriol.* 2010; 192(4):955–63. DOI: 10.1128/JB.01180-09.
4. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.П., Кутырев В.В. Вариативность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, изолированных на территории России в современный период. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2011; 3:11–7.
5. Safa A., Sultana J., Cam P.D., Mwansa J.C., Kong R.Y. *Vibrio cholerae* O1 eltor strains, Asia and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 15(6):987–8. DOI: 10.3201/eid1406.080129.
6. Nguyen B.M., Lee J.H., Cuong N.T., Choi S.Y., Hien N.T., Anh D.D., Lee H.R., Ansaruzzaman M., Endtz H.P., Chun J., Lopez A.L., Czerkinsky C., Clemens J.D., Kim D.W. Cholera outbreaks caused by an altered *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype strain producing classical toxin B in Vietnam in 2007 to 2008. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(5):1568–71. DOI: 10.1128/JCM.02040-08.
7. Raychoudhuri A., Patra T., Ghosh K., Ramamurthy T., Nandy R.K., Takeda Y., Balakrish-Nair G., Mukhopadhyay A.K. Classical *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(1):131–2. DOI: 10.3201/eid1501.080543.
8. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. DOI: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
9. Ghosh-Banerjee J., Senoh M., Takahashi T., Hamabata T., Barman S., Koley H., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T., Chatterjee S., Asakura M., Yamasaki S., Nair G.B., Takeda Y. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor end classical biotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11):4283–6. DOI: 10.1128/JCM.00799-10.
10. Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S., Bruce D.C., Dettler J.C., Han C.S., Chertkov O., Challacombe J., Huq A., Nair G.B., Colwell R.R. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 2010; 192(13):3524–33. DOI: 10.1128/JB.00040-10.
11. Siddique A.K., Nair G.B., Alam M., Sack D.A., Huq A., Nizam A., Longini I.M. Jr., Qadri F., Faruque S.M., Colwell R.R.,

Ahmed S., Iqbal A., Bhuiyan N.A., Sack R.B. El Tor cholera with severe disease: a new threat to Asia and beyond. *Epidemiol. Infect.* 2010; 138(3):347–52. DOI: 10.1017/S0950268809990550.

12. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M., Siddique A.K., Qadri F., Izumiya H., Nair G.B., Watanabe H. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCA assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *Microbiol. Immunol.* 2008; 52(6):314–7. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2008.00041.x.

13. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque S.M., Faruque A.S., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(11):4211–3. DOI: 10.1128/JCM.01304-06.

14. Савельева И.В., Куличенко А.Н., Ковалев Д.А., Жиров А.М., Савельев В.Н. Эволюция генома холерного вибриона биовара Эль Тор и разработка ПЦР-тест-системы для идентификации штаммов возбудителя холеры. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы: материалы Проблемной комиссии. Ростов н/Д; 2017. Вып. 30. С. 172–7.

15. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Шубина А.В., Заднова С.П., Кутырев В.В. Способ идентификации токсигенных штаммов *V. cholerae* O1, определения их биовара и дифференциации штаммов биовара Эль Тор на типичные и измененные методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления. Патент РФ № 2458141, опубл. 10.08.2012. Бюл. № 22.

16. Шашкова А.В., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Конструирование ПЦР-тест-системы для идентификации токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, определения их биовара и дифференциации штаммов Эль Тор вибрионов на типичные и измененные. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2011; 4(110):49–52. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-49-52.

17. Савельев В.Н., Савельева И.В., Сосунгов В.В., Ковалев Д.А., Подопригора Е.И., Васильева О.В., Гусева Л.В. Способ идентификации штаммов *Vibrio cholerae* O1, определения их токсигенности и биовара с дифференциацией биовара Эль Тор на типичные и генетически измененные варианты методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления с учетом результатов в режиме «реального времени». Патент РФ № 2732448, опубл. 16.09.2020. Бюл. № 26.

References

1. De Haan L., Hirst T.R. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms. *Mol. Membr. Biol.* 2004; 21(2):77–92. DOI: 10.1080/09687680410001663267.
2. Dziejman M.E., Balon D., Boyd C.M., Fraser J.F., Heidelberg J.J., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and handemic disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002; 99(3):1556–61. DOI: 0.1073/pnas.042667999.
3. Pradhan S., Baidya A.K., Ghosh A., Paul K., Chowdhury R. The El Tor biotype of *Vibrio cholerae* exhibits *Vibrio cholerae* a growth advantage in the stationary phase in mixt cultures with the classical biotype. *J. Bacteriol.* 2010; 192(4):955–63. DOI: 10.1128/JB.01180-09.
4. Smirnova N.I., Zаднова S.P., Shashkova A.P., Kutyrev V.V. [Genome variability of altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor isolated on the territory of Russia in the modern period]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2011; 3:11–7.
5. Safa A., Sultana J., Cam P.D., Mwansa J.C., Kong R.Y. *Vibrio cholerae* O1 eltor strains, Asia and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 15(6):987–8. DOI: 10.3201/eid1406.080129.
6. Nguyen B.M., Lee J.H., Cuong N.T., Choi S.Y., Hien N.T., Anh D.D., Lee H.R., Ansaruzzaman M., Endtz H.P., Chun J., Lopez A.L., Czerkinsky C., Clemens J.D., Kim D.W. Cholera outbreaks caused by an altered *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype strain producing classical toxin B in Vietnam in 2007 to 2008. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(5):1568–71. DOI: 10.1128/JCM.02040-08.
7. Raychoudhuri A., Patra T., Ghosh K., Ramamurthy T., Nandy R.K., Takeda Y., Balakrish-Nair G., Mukhopadhyay A.K. Classical *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(1):131–2. DOI: 10.3201/eid1501.080543.
8. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. DOI: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
9. Ghosh-Banerjee J., Senoh M., Takahashi T., Hamabata T., Barman S., Koley H., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T., Chatterjee S., Asakura M., Yamasaki S., Nair G.B., Takeda Y. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor end classical biotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11):4283–6. DOI: 10.1128/JCM.00799-10.

10. Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S., Bruce D.C., Detter J.C., Han C.S., Chertkov O., Challacombe J., Huq A., Nair G.B., Colwell R.R. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 2010; 192(13):3524–33. DOI: 10.1128/JB.00040-10.
11. Siddique A.K., Nair G.B., Alam M., Sack D.A., Huq A., Nizam A., Longini I.M. Jr., Qadri F., Faruque S.M., Colwell R.R., Ahmed S., Iqbal A., Bhuiyan N.A., Sack R.B. El Tor cholera with severe disease: a new threat to Asia and beyond. *Epidemiol. Infect.* 2010; 138(3):347–52. DOI: 10.1017/S0950268809990550.
12. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M., Siddique A.K., Qadri F., Izumiya H., Nair G.B., Watanabe H. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCA assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *Microbiol. Immunol.* 2008; 52(6):314–7. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2008.00041.x.
13. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque S.M., Faruque A.S., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(11):4211–3. DOI: 10.1128/JCM.01304-06.
14. Savel'eva I.V., Kulichenko A.N., Kovalev D.A., Zhirov A.M., Savel'ev V.N. [Evolution of the genome of *Vibrio cholerae* biovar El Tor and the development of a PCR test-system for the identification of cholera pathogen strains]. In: [Cholera and Vibrios Pathogenic for Humans: Proceedings of the Problem Commission]. Rostov-on-Don; 2017. Vol. 30. P. 172–7.
15. Smirnova N.I., Goryaev A.A., Shubina A.V., Zadnova S.P., Kuttyrev V.V. Method for identification of toxigenic *V. cholerae* O1 strains, determination of their biovar and differentiation of El Tor biovar strains into typical and modified by multiplex polymerase chain reaction and a test system for its implementation. RF patent No. 2458141, publ. 10.08.2012. Bul. No. 22.
16. Shashkova A.V., Goryaev A.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I., Kuttyrev V.V. Construction of the PCR test-system for the detection of *Vibrio cholerae* O1 toxigenic strains, for indication of their biovar and for differentiation between typical and altered El Tor-vibrio strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2011; (4(110)):49–52. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-49-52.
17. Savel'ev V.N., Savel'eva I.V., Sosunov V.V., Kovalev D.A., Podoprigora E.I., Vasil'eva O.V., Guseva L.V. Method for identification of *Vibrio cholerae* O1 strains, determination of their toxigenicity and biovar with differentiation of El Tor biovar into typical and genetically modified variants by multiplex polymerase chain reaction, and a test system for its implementation with registration of results in real-time mode. RF patent No. 2732448, publ. 16.09.2020. Bul. No. 26.

Authors:

Savel'ev V.N., Kulichenko A.N., Savel'eva I.V., Kovalev D.A., Taran T.V., Podoprigora E.I. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.
 Sosunov V.V., Radaeva T.V. “DNK-SINTEZ” LLC. 9, Lokomotivny Avenue, Moscow, 127238, Russian Federation. E-mail: info@oligos.ru.

Об авторах:

Савельев В.Н., Куличенко А.Н., Савельева И.В., Ковалев Д.А., Таран Т.В., Подопригора Е.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.
 Сосунов В.В., Радаева Т.В. ООО «ДНК-СИНТЕЗ». Российская Федерация, 127238, Москва, Локомотивный пр., 9. E-mail: info@oligos.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-128-136

УДК 616.98:578.233.44

М.А. Сайфуллин¹, Е.А. Кольцова¹, Я.А. Симонова¹, Е.А. Макиев¹, Е.А. Климова², Е.Ю. Пылаева¹,
Н.Н. Зверева¹, Н.Ю. Пшеничная³

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СРЕДСТВ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ ПАССАЖИРАМИ МОСКОВСКОГО МЕТРОПОЛИТЕНА В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ COVID-19

¹ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва, Российская Федерация; ²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация; ³ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», Москва, Российская Федерация

Метрополитен является наиболее важным транспортным средством в Москве. Активные потоки пассажиров в метро могут способствовать распространению инфекционных заболеваний с аэрогенным и контактным механизмами передачи, в том числе коронавирусной инфекции COVID-19. **Цель** исследования – оценка приверженности к использованию средств индивидуальной защиты (СИЗ; гигиенические маски, перчатки) пассажирами московского метрополитена. **Материалы и методы.** Проведено проспективное исследование, основанное на визуальной оценке пассажиров, находящихся в подвижном составе московского метрополитена, с разделением на когорты использующих маски и перчатки (К1), только маски (К2), использующих маски с нарушением правил применения (К3) и не использующих средства индивидуальной защиты (К4). Наблюдения проводились в течение 42-й и 43-й недель 2020 г. в различных кластерах метрополитена с разделением по времени на утреннее, дневное и вечернее. Дополнительно пассажиры ранжировались на группы по роду занятий во время поездки. Статистическая обработка включала выявление частот, их 95 % доверительных интервалов. Для сравнения значимости различий распространенности признаков в парных группах использовались методы четырехпольных таблиц (χ^2 Пирсона). **Результаты и обсуждение.** Валидировано 18053 наблюдения с охватом 61,3 % станций. Мужчины составили 54,7 % (9867 пассажиров). За время наблюдения установлены следующие доли: К1 – 5,2 % (95 % ДИ 4,9–5,5), К2 – 51,9 % (95 % ДИ 51,2–52,7), К3 – 26,9 (95 % ДИ 26,2–27,6), К4 – 16 % (95 % ДИ 15,4–16,6). Среди мужчин приверженность к использованию СИЗ значимо меньше. На наземных линиях установлена самая низкая доля пассажиров, использующих СИЗ. Среди пассажиров, использующих электронные устройства и бумажные носители информации, установлена более высокая доля носящих маски с нарушением правил применения по сравнению с пассажирами без занятий. Среди пассажиров, использующих электронные устройства, – самая низкая доля, использующих перчатки. В течение двух недель наблюдения установлено значимое увеличение частоты использования СИЗ.

Ключевые слова: COVID-19, метро, транспорт, маски, перчатки, пассажиры, пандемия, смартфон.

Корреспондирующий автор: Сайфуллин Мухаммад Абдулфаритович, e-mail: dr_saifullin@mail.ru.

Для цитирования: Сайфуллин М.А., Кольцова Е.А., Симонова Я.А., Макиев Е.А., Климова Е.А., Пылаева Е.Ю., Зверева Н.Н., Пшеничная Н.Ю. Использование средств индивидуальной защиты пассажирами московского метрополитена в условиях пандемии COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:128–136. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-128-136

Поступила 29.12.2020. Отправлена на доработку 01.06.2021. Принята к публ. 09.06.2021.

М.А. Saifullin¹, E.A. Kol'tsova¹, Ya.A. Simonova¹, E.A. Makiev¹, E.A. Klimova², E.Yu. Pylaeva¹,
N.N. Zvereva¹, N.Yu. Pshenichnaya³

Use of Personal Protection Equipment by Moscow Subway Passengers under Conditions of COVID-19 Pandemic

¹Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

²First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

³Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The Subway is the most important means of transport in Moscow. The active flows of passengers in the metro can contribute to the spread of infectious diseases with airborne and contact mechanisms of transmission, including the coronavirus infection COVID-19. **The aim** of the study was to assess the level of adherence to the use of personal protective equipment (facial masks, gloves) by passengers of the Moscow Subway. **Materials and methods.** A prospective study based on a visual assessment of passengers in a rolling stock of the Moscow subway, with division into cohorts of those using masks and gloves (K1), using only masks (K2), using masks in violation of the rules of use (K3) and not using personal protection equipment (K4) was conducted. Observations were carried out during the 42nd and 43rd weeks of 2020 in various subway clusters with a division in time into morning, afternoon and evening hours. Additionally, passengers were ranked into groups by occupation during the trip. Statistical processing included the identification of frequencies, their 95 % confidence intervals. To compare the significance of differences in the prevalence of features in paired groups, the methods of 4-field tables (χ^2 Pearson) were used. **Results and discussion.** 18053 observations were validated, covering 61.3 % of stations. Men accounted for 54.7 % (9867). During the observation period, the following shares were established: K1 – 5.2 % (95 % CI 4.9–5.5), K2 – 51.9 % (95 % CI 51.2–52.7), K3 – 26.9 (95 % CI 26.2–27.6), K4 – 16 % (95 % CI 15.4–16.6). The level of adherence to the proper use of PPE is significantly lower among men. Land lines have the lowest proportion of passengers using PPE. Among passengers using electronic devices

and paper media, a higher proportion of those wearing masks with violation of the rules of use, compared to passengers without activities, was established. Among passengers using electronic devices, the proportion of those using gloves is the lowest. Within two weeks of follow-up, a significant increase in the frequency of PPE use was revealed.

Key words: COVID-19, subway, transport, masks, gloves, passengers, pandemic, smart phone.

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

Corresponding author: Mukhammad A. Saifullin, e-mail: dr_saifullin@mail.ru.

Citation: Saifullin M.A., Kol'tsova E.A., Simonova Ya.A., Makiev E.A., Klimova E.A., Pylaeva E.Yu., Zvereva N.N., Pshenichnaya N.Yu. Use of Personal Protection Equipment by Moscow Subway Passengers under Conditions of COVID-19 Pandemic. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:128–136. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-128-136

Received 29.12.2020. Revised 01.06.2021. Accepted 09.06.2021.

Saifullin M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1058-3193>

Kol'tsova E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3143-4894>

Simonova Ya.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6179-5375>

Makiev E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7062-958X>

Klimova E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6259-4439>

Pylaeva E.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4142-0998>

Zvereva N.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2699-0439>

Pshenichnaya N.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2570-711X>

Пандемия COVID-19 потребовала введения ограничительных мер для снижения темпов ее стремительного распространения. Аэрогенный механизм передачи коронавируса SARS-CoV-2 не вызывал сомнения практически с самого начала пандемии. В начале 2020 г. исследования показали длительное сохранение жизнеспособности SARS-CoV-2 в аэрозоле до 3 часов и на поверхностях до 72 часов [1]. Дальнейшие исследования продемонстрировали обширную и длительную контаминацию вирусной РНК палат, медицинских изделий и электронных устройств [2–4]. Хотя лишь в одном исследовании [2] обнаружение генетического материала сопровождалось выделением жизнеспособного вируса, описано распространение COVID-19 в медицинских учреждениях, на предприятиях питания и транспорте [2, 4]. Наиболее резонансной была вспышка заболевания на круизном лайнере *Diamond Princess*, возникшая в начале февраля 2020 г., давшая понимание существенной роли бессимптомных носителей в передаче вируса [3, 5, 6].

Роль городского общественного транспорта в распространении респираторных инфекций тоже неоспорима и изучена на примере гриппа [7, 8]. Н. Фуруа в исследовании 2007 г. установил прямую корреляцию заболевания гриппом с длительностью поездки и количеством пассажиров и обратную – с интенсивностью вентиляции в поезде [8]. Исследование, проведенное в Лондоне в 2018 г., показало, что в районах, не имеющих прямого доступа к метро, заболеваемость гриппом была ниже, а в районах с периферийными станциями метро – выше, что авторы связывают с большим временем, затрачиваемым жителями на поездки в транспорте [7]. Исследование в Китае показало, что COVID-19 имеет высокий риск передачи среди пассажиров поездов, но этот риск различен в зависимости от времени в пути и количества контактов [9]. Во время вспышки COVID-19 в г. Ухань метрополитен (199 станций, 283 км путей) был закрыт с 23 января по 28 марта, что, по мнению исследователей, в совокупности с остальными мерами способствовало сдерживанию распространения заболевания [10, 11].

Московский метрополитен (ММ) является наиболее важным общественным транспортом в столице и представляет собой широко разветвленную сеть

линий, связывающих большую часть районов города, десять московских вокзалов и узлы пересадки с четырьмя аэропортами. Ввод московских центральных диаметров (МЦД) позволил интегрировать в систему близлежащие города Московской области. С учетом МЦД, а также московского центрального кольца (МЦК) и монорельсовой транспортной системы протяженность линий составляет 780 км, а количество станций – 333 [12]. В среднем в будни ММ обслуживает 9 млн пассажиров с пиковыми нагрузками в утреннее и вечернее время (так называемые часы пик). Пропускная и провозная способность линий определяется действующими санитарными правилами, максимальная загрузка строится из расчета, что все места для сидения заняты пассажирами и на 1 м² свободной площади пола пассажирского салона размещается стоя не более 4,5 пассажира [13].

Активные потоки пассажиров в метро, невозможность соблюдения социальной дистанции в часы пик могут способствовать распространению инфекционных заболеваний с аэрогенным и контактным механизмами передачи. Обязательное использование масок и перчаток в общественном транспорте в Москве было введено с 12.05.2020 указом от 07.05.2020 № 55-УМ «О внесении изменений в указ Мэра Москвы от 5 марта 2020 г. № 12-УМ».

В настоящее время общепринято мнение о профилактической эффективности механической защиты дыхательных путей при SARS-CoV-2 [13–17]. В отношении использования перчаток однозначного мнения нет: в рекомендациях CDC использование перчаток необходимо при уходе за больным и уборке помещений, а в иных случаях их использование не дает надежной защиты и может привести к распространению микроорганизмов [14]. ВОЗ также не рекомендует использование перчаток в общественных местах, заменяя эту меру регулярной дезинфекцией рук [15]. По данным Роспотребнадзора, повседневное ношение медицинской маски снижает вероятность заражения различными респираторными инфекциями в 1,8 раза, использование перчаток – в 1,3 раза, но при непосредственном контакте с больным использование перчаток снижает риск в 2,7 раза [18]. Согласно постановлению Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 16.10.2020 № 31, на территории РФ

обязательно ношение гигиенических масок в общественном транспорте, при этом использование перчаток не декларируется. На момент проведения исследования и написания статьи использование гигиенических масок и перчаток в общественном транспорте Москвы было обязательным.

На момент начала исследования в доступных источниках нами не обнаружено каких-либо научных трудов об использовании средств индивидуальной защиты (СИЗ) в общественном транспорте на территории России.

Цель исследования – оценить приверженность пассажиров московского метрополитена к использованию СИЗ (гигиенические маски, перчатки).

Задачи исследования:

- оценить процент пассажиров, соблюдающих масочный режим на различных кластерах московского метрополитена (наземный, подземный, различные линии);
- оценить доли пассажиров, использующих СИЗ в различное время дня (утренние, дневные и вечерние часы);
- определить наличие или отсутствие гендерных различий среди когорт пассажиров;
- определить наличие или отсутствие связи соблюдения противоэпидемического режима с родом занятий пассажира (использование бумажных носителей информации, электронных устройств или отсутствие каких-либо занятий).

Материалы и методы

Проспективное продольное популяционное когортное исследование проводилось с 12 по 23 октября 2020 г. (42-я и 43-я календарные недели) в будние дни.

Для оценки распространенности исследуемого признака наблюдения проводились в различных кластерах транспортной системы (наземный и подземный; различные районы Москвы), время наблюдения ранжировалось на утреннее (с открытия метро в 05:45 до 09:00 утра), дневное (9–17 часов) и вечернее (17–21 час). В более поздние часы наблюдения не проводились в связи с приоритетом безопасности исследователей.

По приверженности к использованию СИЗ пассажиры ранжировались на четыре когорты (табл. 1).

Кроме того, для оценки приверженности к использованию СИЗ пассажиры ранжировались на группы по роду занятий: без определенных занятий и использующие информационные носители. Последняя группа была подразделена на пассажиров, использующих электронные устройства (ЭУ) и бумажные носители информации (БН).

Методика проведения наблюдений: исследователь проводил сплошную выборку в секции вагона после закрытия дверей и начала движения поезда.

Для исключения повторного подсчета одного и того же пассажира на каждой станции проводилась

Таблица 1 / Table 1

Когорты наблюдаемых пассажиров
Cohorts of observed passengers

Код когорты Cohort code	Признак Feature
K1	Использующие маску и перчатки Using mask and gloves
K2	Использующие только маску Using only mask
K3	Использующие маску с нарушением правил ношения Using the mask in violation of the rules of wearing
K4	Не использующие маску Not using mask

смена секции/вагона. При пересадках с одной линии на другую с этой же целью подсчет проводился во втором по счету поезде в связи с большим количеством пассажиров, осуществляющих пересадку. Подсчет велся среди пассажиров, соответствовавших критериям включения: нахождение в подвижном составе и доступность визуальному осмотру. Из исследования исключались работники метрополитена, служащие полиции и Росгвардии, находившиеся при исполнении служебных обязанностей (с наличием нагрудного жетона), а также пассажиры, чью гендерную принадлежность визуально установить было невозможно. Нумерация линий ММ проведена согласно официально принятой.

Все наблюдения заносились в карту оценки пассажиров (чек-лист) с последующим переносом в электронную таблицу. Так как для статистической обработки были доступны только качественные признаки, проводился подсчет распространенности признака с определением его 95 % доверительного интервала (ДИ) с проведением бутстрепа на 1000 выборок. Для сравнения значимости различий распространенности признаков в парных группах использовались методы четырехпольных таблиц (χ^2 Пирсона). Статистическая обработка проводилась с помощью программ MS Excel 2010 и IBM SPSS Statistics 23.

Результаты и обсуждение

Данные исследованной выборки. Всего валидировано 18053 наблюдения, проведенные на 11 линиях метрополитена и двух центральных диаметрах (МЦД) с охватом 203 станций (61,3 % от действующих станций метрополитена). Среди наблюдаемых пассажиров было 9867 мужчин (54,7 %). За 42-ю неделю проведено 8084 (44,8 %), за 43-ю неделю – 9969 (55,2 %) наблюдений. Наблюдения по линиям метро были неравномерными; в связи с тем, что количество наблюдений на МЦД-1 составило 34 (0,2 %), оба центральных диаметра были объединены. Гендерные различия на линиях колебались: от 50 % (линии 1, 10) до преобладания мужчин – 64,4 % (МЦД). Соотношения представлены на рис. 1.

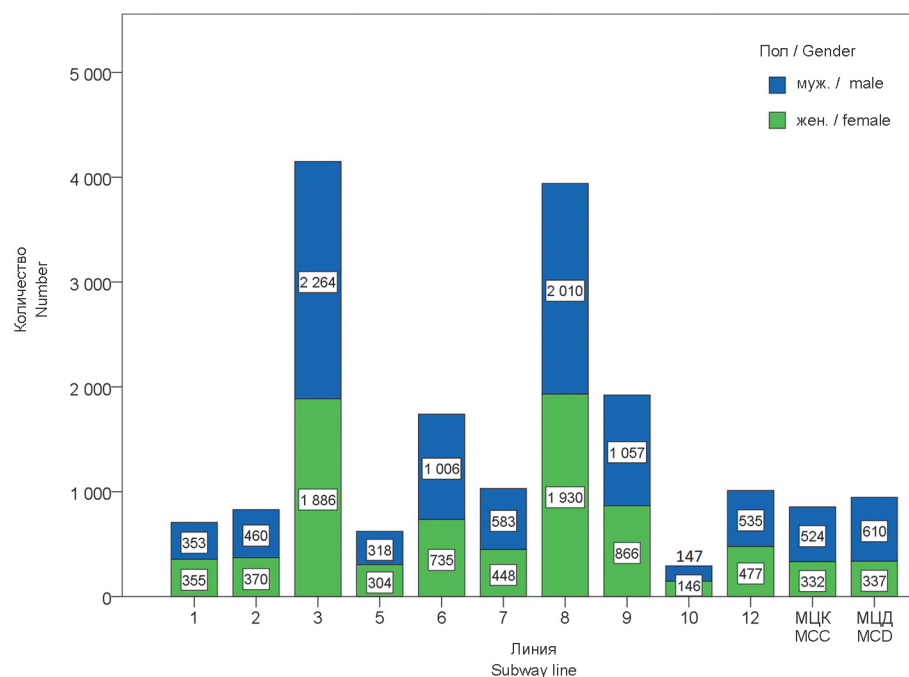


Рис. 1. Распределение наблюдений по линиям метрополитена (нумерация линий соответствует официально принятой)

Fig. 1. Distribution of observations by subway lines (line numbering corresponds to the officially adopted one)

Общее количество наблюдений составило: К1 – 937 (5,2 %; 95 % ДИ 4,9–5,5), К2 – 9377 (51,9 %; 51,2–52,7), К3 – 4858 (26,9 %; 26,2–27,6), К4 – 2881 (16 %; 15,4–16,6) пассажиров. При анализе гендерных особенностей статистически значимые различия ($p < 0,001$) установлены в когортах 1, 2 и 4 (табл. 2).

Распределение по линиям метро. При анализе когорт по линиям метро установлено, что доля К1 составила от 1,4 % (95 % ДИ 1–1,8) на линии 8 до 7,8 % (6,5–9,1) на линии 9, К2 – от 41,8 % (31,8–45,1) на МЦД до 60,8 % (55–66,3 %) на линии 10, К3 – от 20,9 % (18,3–23,5) на МЦД до 31,4 % на линии 3. Наибольший разброс установлен в К4 – от 9,2 % (6–12,5 %) на линии 10 до 34 % (30,9–37,1).

Предварительный анализ данных позволил обозначить очевидные различия в составе когорт в наземных (МЦД и МЦК, $n=1803$) и подземных линиях метро¹ ($n=16250$) и разделить данные на соответствующие кластеры, при анализе которых установ-

лены статистически значимые различия в когортах 1, 2 и 4 (рис. 2).

При оценке распространенности признаков в течение двух недель отмечено увеличение доли К1 с 2,3 до 7,5 % ($p < 0,001$), К3 – с 24,8 до 28,6 % ($p < 0,001$) и уменьшение доли К4 с 20,3 до 12,4 % ($p < 0,001$). Статистически значимых изменений доли К2 не установлено. Наиболее очевидные динамические различия были в наземном и подземном кластерах (рис. 3).

В подземном кластере отмечено увеличение доли К1 с 2,4 % (95 % ДИ 2,1–2,7) до 8 % (7,4–8,6), К3 – с 25,1 % (24,2–26,2) до 28,7 % (27,8–29,7), уменьшение доли К4 с 19 % (18,1–19,9) до 11,1 % (10,5–11,8). В наземном кластере – увеличение доли К3 с 21,7 % (18,9–24,7) до 27,4 % (24,9–30,2) и уменьшение доли К4 с 33,6 % (30,1–37,1) до 23,3 % (20,7–26). В наземном кластере не отмечено значимых изменений в К1, доли К2 практически не изменились в обоих кластерах.

Таблица 2 / Table 2

Гендерные различия в когортах пассажиров
Gender differences in passenger cohorts

Когорта Cohort	Мужчины Men		Женщины Women		Всего Total	
	кол-во number	% (95 % ДИ) % (95% CI)	кол-во number	% (95 % ДИ) % (95% CI)	кол-во number	% (95 % ДИ) % (95% CI)
К1	357	3,6 (3,1–4)	580	7,1 (6,5–7,6)	937	5,2 (4,9–5,5)
К2	4973	50,4 (41,6–51,4)	4404	53,8 (52,7–54,9)	9377	51,9 (51,2–52,7)
К3	2672	27,1 (26,3–27,9)	2186	26,7 (25,7–27,7)	4858	26,9 (26,2–27,6)
К4	1865	18,9 (18,1–19,9)	1016	12,4 (11,7–13,1)	2881	16 (15,4–16,6)
Всего Total	9867	100	8186	100	18053	100

¹ Большинство линий метро имеют наземные участки, в связи с чем к наземному кластеру отнесены линии, у которых более 50 % протяженности проходит по поверхности.

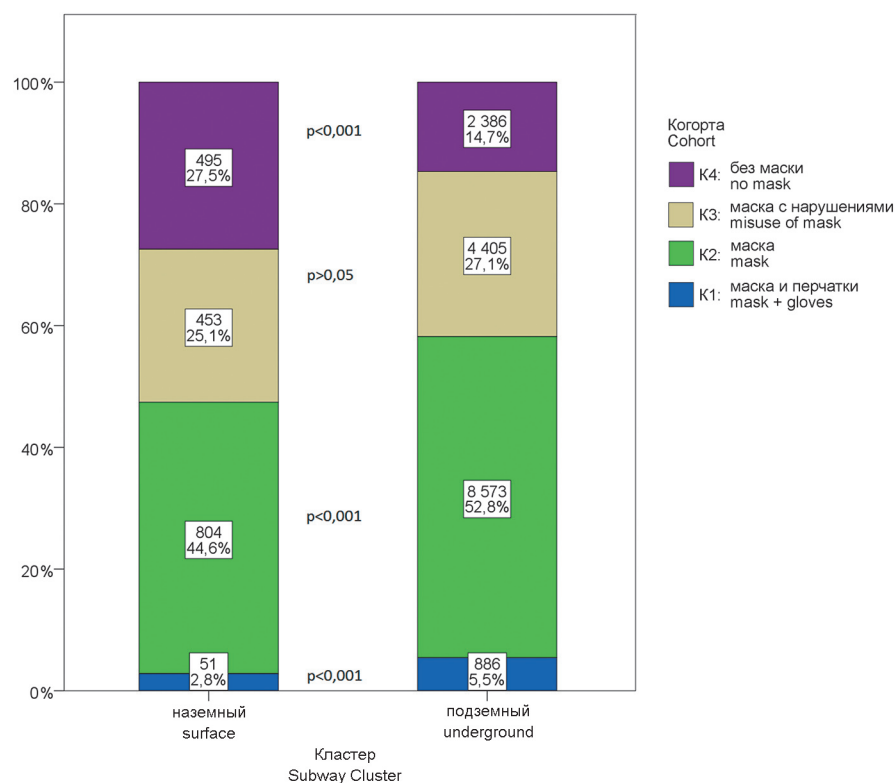


Рис. 2. Распределение когорт по наземному и подземному кластерам

Fig. 2. Distribution of cohorts by surface and underground subway clusters

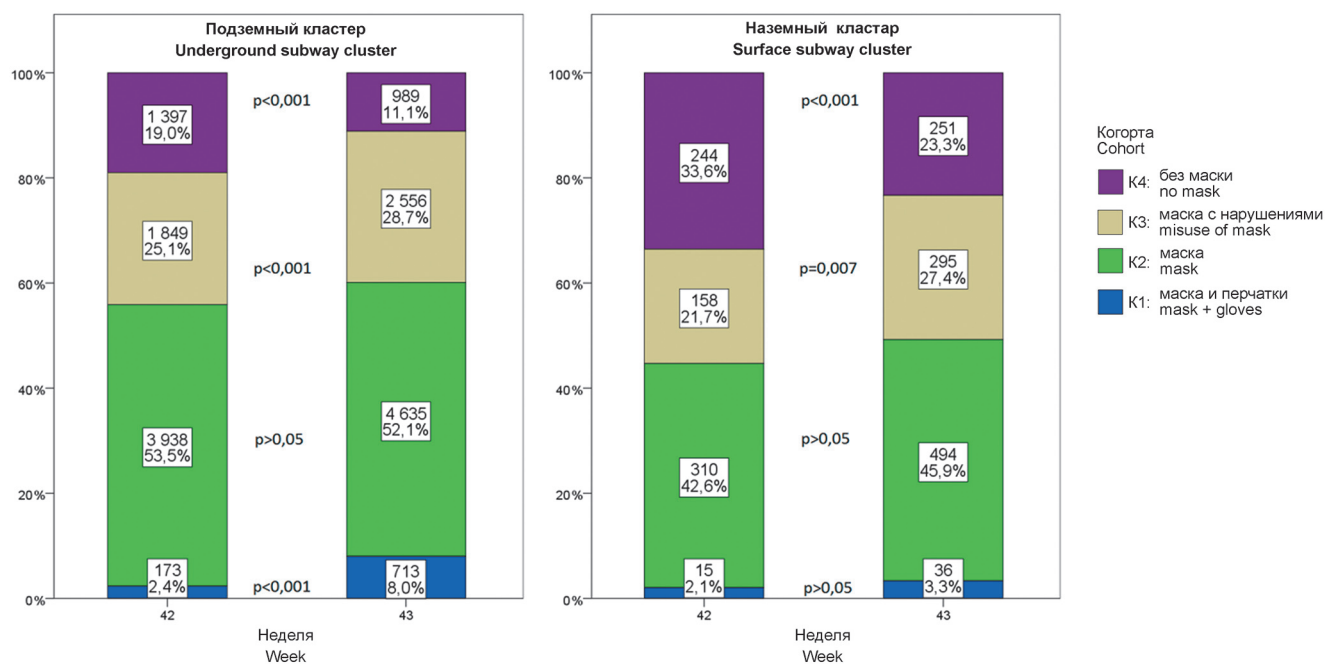


Рис. 3. Изменение соотношения когорт на 42-й и 43-й неделях в наземном и подземном кластерах

Fig. 3. Change in the ratio of cohorts at 42nd and 43rd weeks in the surface and underground subway clusters

Распределение в зависимости от времени суток. При анализе распределения когорт в зависимости от времени суток нами установлено, что доля К1 в вечернее время (18–21 ч) составила 4,3 % (ДИ 3,8–4,9). В сравнении с утренним и дневным временем данный показатель был значимо меньше ($p=0,001$). В других когортах значимых различий не установлено.

Распределение когорт в зависимости от направления движения. При оценке долей когорт в различных направлениях движения ММ установлено, что доля К4 составила 14,9 % (ДИ 14,1–15,7), значимо отличаясь от аналогичных показателей при движении в центр (16,6 % [15,8–17,4], $p=0,003$) и кольцевого направления (17,9 % [16–19,8], $p=0,004$). В других когортах значимых различий не установлено (рис. 4).

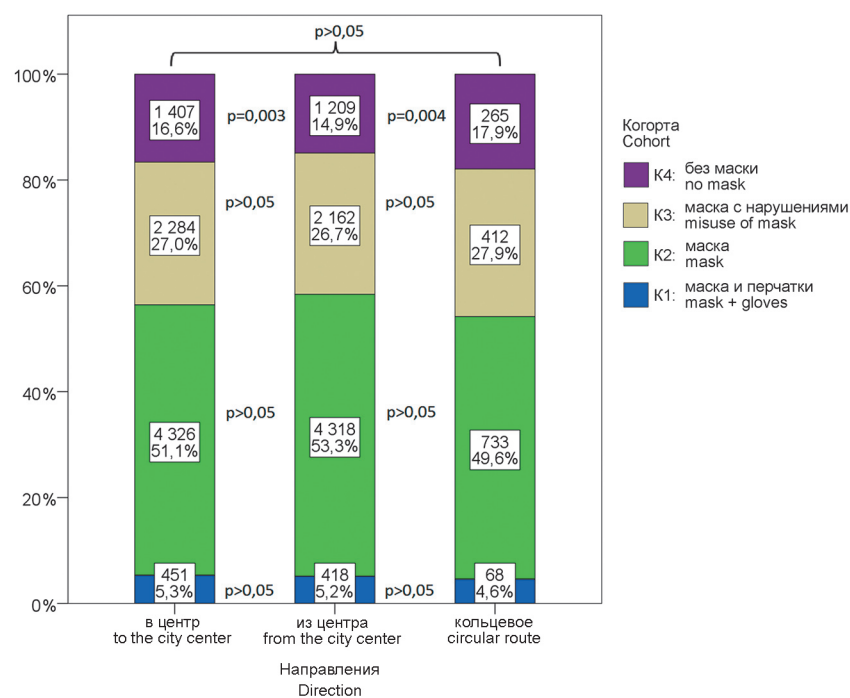


Рис. 4. Распределение когорт при движении в различных направлениях

Fig. 4. Distribution of cohorts moving in different directions

Распределение когорт в зависимости от рода занятий. В нашем наблюдении зарегистрировано 8784 (48,7 %) пассажира без занятий, 8584 (47,5 %) – использующих ЭУ, 685 (3,8 %) – БН. При сравнительном анализе установлены значимые различия доли К1: в группе без занятий – 8,2 % (ДИ 7,6–8,7), использующих БН – 5,0 % (3,4–6,8), использующих ЭУ – 2,2 % (1,9–2,5). Доля К3: в группе без занятий (24,3 % [23,3–25,2]) выявлены значимые различия с остальными группами, тогда как между использующими ЭУ и БН значимых различий не установлено. Доля К4: в группе БН – 12,7 % (10,2–15,4), что статистически значимо меньше в сравнении с группой

ЭУ – 17,1 % (16,3–17,9), но в сравнении с группой без занятий (15,1 % [14,3–15,9]) значимых различий не установлено. Между группой без занятий и группой ЭУ также значимых различий не выявлено (рис. 5). Доля К2 во всех группах значимо не различалась.

Проведенное исследование показало, что приверженность к правильному использованию СИЗ в подвижном составе ММ в первой половине октября 2020 г. отмечена у более 50 % пассажиров, за исключением МЦД, на которых данный показатель составил 45 %. В течение двух недель наблюдения отмечен рост доли пассажиров, использующих СИЗ. В качестве причины мы предполагаем два возможных фак-

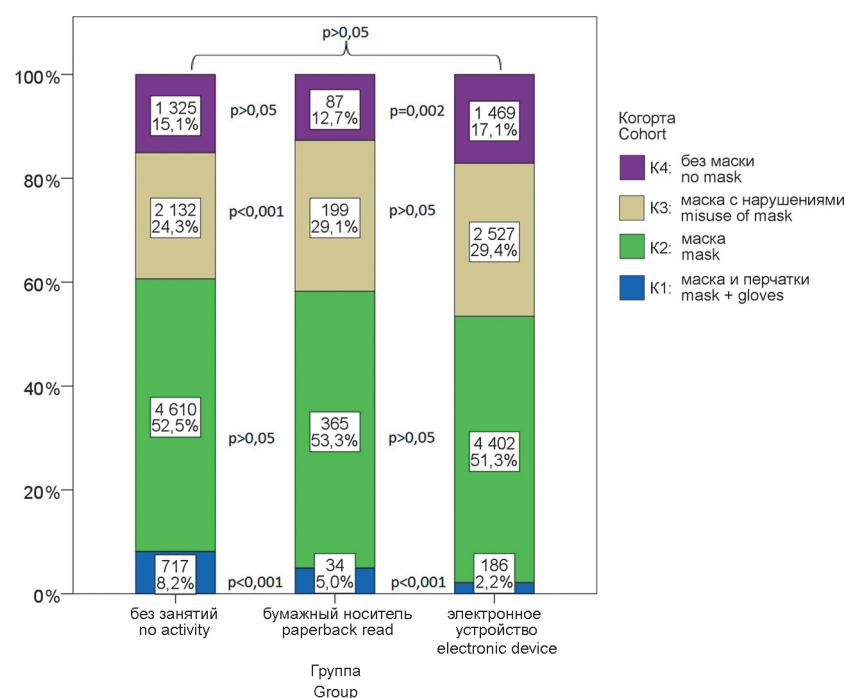


Рис. 5. Распределение когорт в зависимости от рода занятий во время поездки

Fig. 5. Distribution of cohorts by the type of activity during the trip

тора: увеличение заболеваемости COVID-19 с 4395 до 5478 человек в сутки в Москве, а также усиление контроля, связанное с постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 16.10.2020 № 31. Влияние повышения заболеваемости должно было привести к увеличению доли пассажиров, использующих СИЗ, равномерно на всех линиях метро. Однако значимые различия динамики дали основание считать, что усиление контроля использования СИЗ на 43-й неделе привело к увеличению комплаенса в подземном кластере, но практически не оказало влияния на наземные линии. Таким образом, можно заключить, что меньшую долю пассажиров, использующих маски в наземном кластере, можно связать с двумя факторами. Во-первых, меньшая возможность контроля исполнения, так как некоторые станции не имеют контрольно-пропускной системы и оборудованы лишь автоматическими валидаторами проездных документов. Во-вторых, расположение станций на открытом воздухе снижает приверженность к использованию масок. Проезд же пассажира в закрытом вагоне уравнивает риски при проезде в обоих кластерах, вследствие чего наземные линии следует считать территорией с более высоким риском заражения по сравнению с подземными. Увеличение частоты ношения маски с нарушением правил использования в течение двух недель может свидетельствовать о том, что мотивация пассажиров к ношению СИЗ связана не с ростом заболеваемости, а с усилением контроля. Так как формально в данной ситуации указ мэра Москвы исполняется, то именно эта группа пассажиров может увеличивать эпидемиологический риск в общественном транспорте. Использование лицевых масок вместе с перчатками в метро в нашем исследовании варьировалось от 1,4 до 8,1 % на различных линиях.

При оценке использования СИЗ в различное время дня мы установили, что в вечернее время пассажиры ММ в меньшей степени прибегают к использованию перчаток. При анализе зависимости вида занятий от времени суток установлено, что в утреннее время использующие ЭУ составили 40,7 % (ДИ 39,5–41,9), что меньше в сравнении с дневным – 52,1 % (50,7–53,4) и вечерним 50,8 % (49,5–52) временем. Значимых различий в дневное и вечернее время не выявлено, что можно объяснить двумя факторами: более частое использование электронных устройств и снижение внимания в конце рабочего дня. Также установлено, что в направлении из центра к периферии доля пассажиров, не использующих СИЗ, выше, чем в других направлениях, что, возможно, связано со снижением концентрации внимания пассажиров.

Интересным представляется наблюдение за использованием СИЗ в зависимости от занятий в транспорте: значимое снижение доли использования перчаток среди пассажиров, использующих ЭУ, убедительно объясняется необходимостью тактильного контакта с дисплеем устройства. В этой же группе выявлена наибольшая доля пассажиров, не исполь-

зующих СИЗ, причем в сравнении с группой, использующей БН, это различие имеет статистическую значимость. В обеих группах, использующих БН и ЭУ, значимо выше доля пассажиров, носящих маску с нарушением правил использования. Мы можем объяснить это явление переключением внимания данных групп пассажиров на используемые предметы. Стоит отметить, что при использовании ЭУ без перчаток происходит дополнительная контаминация самого устройства, потенциально становящегося предметом переноса микроорганизмов. Наши данные позволяют считать пользователей ЭУ группой с повышенным риском заражения в общественном транспорте.

Таким образом, несмотря на введенный режим использования СИЗ, московский метрополитен остается зоной повышенного риска заражения COVID-19. Учитывая отсутствие возможности эффективного разобщения пассажиров, наиболее надежным для индивидуальной и коллективной защиты мы считаем ношение масок с соблюдением правил их использования, включая своевременную их смену. Низкий процент использования перчаток увеличивает риск контаминации кожи, однако и сами перчатки могут также выступать в качестве коллектора частиц аэрозоля и микроорганизмов, что при невозможности их обработки и смены снижает эффективность в профилактике заражения. Принимая во внимание имеющиеся рекомендации, мы считаем, что для снижения контактной передачи COVID-19 следует рекомендовать частую дезинфекцию рук и экранов электронных устройств. И если профилактическая эффективность механической защиты кожного покрова дискуссионна, то широкое и правильное использование лицевых масок снизит площадь контаминации поверхностей вирусом, тем самым приводя к ограничению контактного механизма передачи.

Оценка динамики заболеваемости как во время наблюдения, так и в последующие две недели после наблюдения показала отчетливый тренд к росту заболеваемости в Москве. Значит, даже увеличение приверженности к использованию СИЗ было недостаточным для остановки роста заболеваемости, и требуются дополнительные меры сдерживания эпидемического процесса (изоляция лиц с симптомами ОРВИ, контактных и проведение вакцинации).

Таким образом, приверженность к ношению масок с соблюдением правил использования установлена у более 50 % пассажиров московского метрополитена, 26,9 % пассажиров носят маски с нарушением правил использования, 16 % пассажиров отказались от их использования масок. При этом на различных линиях метро эти показатели имели статистически значимую вариабельность. Наименьшая приверженность к использованию СИЗ наблюдалась на наземных линиях, в первую очередь на МЦД, и среди мужчин. Большая доля мужчин в общей совокупности позволяет отнести их к группе повышенного риска при проезде в общественном транс-

порте. Пассажиры метро, использующие бумажные и электронные носители, чаще носят маски с нарушением правил использования. Среди пассажиров, использующих электронные устройства, отмечалось значимое снижение доли с использованием перчаток. Среди пассажиров, использующих бумажные носители, доля лиц, не использующих СИЗ, ниже по сравнению с другими группами.

Ограничения исследования. Исследование проводилось в основном в рамках рутинных поездок исследователей в транспорте, в связи с чем возникло неравномерное распределение наблюдений на различных линиях метрополитена, но задача охвата более 50 % станций ММ была выполнена. В нашем исследовании не представлялось возможным проводить оценку соответствия СИЗ стандартам противинфекционной защиты, а также продолжительности и кратности их использования. Мы не учитывали возраст, цель и длительность поездки в транспорте, так как эти параметры могут быть исследованы только при индивидуальном опросе пассажира.

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

Список литературы

1. Van Doremalen N., Bushmaker T., Morris D.H., Holbrook M.G., Gamble A., Williamson B.N., Tamin A., Harcourt J.L., Thornburg N.J., Gerber S.I., Lloyd-Smith J.O., De Wit E., Munster V.J. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(16):1564–7. DOI: 10.1056/NEJMc2004973.
2. Ahn J.Y., An S., Sohn Y., Cho Y., Hyun J.H., Baek Y.J., Kim M.H., Jeong S.J., Kim J.H., Ku N.S., Yeom J.-S., Smith D.M., Lee H., Yong D., Lee Y.-J., Kim J.W., Kim H.R., Hwang J., Choi J.Y. Environmental contamination in the isolation rooms of COVID-19 patients with severe pneumonia requiring mechanical ventilation or high-flow oxygen therapy. *J. Hosp. Infect.* 2020; 106(3):570–6. DOI: 10.1016/j.jhin.2020.08.014.
3. Yamagishi T., Ohnishi M., Matsunaga N., Kakimoto K., Kamiya H., Okamoto K., Suzuki M., Gu Y., Sakaguchi M., Tajima T., Takaya S., Ohmagari N., Takeda M., Matsuyama Sh., Shirato K., Nao N., Hasegawa H., Kageyama Ts., Takayama I., Saito Sh., Wada K., Fujita R., Saito H., Okinaka K., Griffith M., Parry A.E., Barnettson B., Leonard J., Wakita T. Environmental sampling for severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 during a COVID-19 outbreak on the Diamond Princess cruise ship. *J. Infect. Dis.* 2020; 222(7):1098–102. DOI: 10.1093/infdis/jiaa437.
4. Zhou Y., Zeng Y., Chen C. Presence of SARS-CoV-2 RNA in isolation ward environment 28 days after exposure. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 97:258–9. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.06.015.
5. Mizumoto K., Kagaya K., Zarebski A., Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25(10):2000180. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000180.
6. Prather K.A., Wang Ch.C., Schooley R.T. Reducing transmission of SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 368(6498):1422–4. DOI: 10.1126/science.abc6197.
7. Goscé L., Johansson A. Analysing the link between public transport use and airborne transmission: mobility and contagion in the London underground. *Environmental Health.* 2018; 17(1):84. DOI: 10.1186/s12940-018-0427-5.
8. Furuya H. Risk of transmission of airborne infection during train commute based on mathematical model. *Environ. Health Prev. Med.* 2007; 12(2):78–83. DOI: 10.1007/BF02898153.
9. Hu M., Lin H., Wang J., Xu C., Tatem A.J., Meng B., Zhang X., Liu Y., Wang P., Wu G., Xie H., Lai S. Risk of COVID-19 transmission in train passengers: an epidemiological and modeling study. *Clin. Infect. Dis.* 2021; 72(4):604–10. DOI: 10.1093/cid/ciaa1057.
10. Tian H., Liu Y., Li Y., Wu C.H., Chen B., Kraemer M.U.G., Li B., Cai J., Xu B., Yang Q., Wang B., Yang P., Cui Y., Song Y., Zheng P., Wang Q., Bjornstad O.N., Yang R., Grenfell B.T., Pybus O.G., Dye C. An investigation of transmission control measures during the first 50 days of the COVID-19 epidemic in China. *Science.* 2020; 368(6491):638–42. DOI: 10.1126/science.abb6105.

ing the first 50 days of the COVID-19 epidemic in China. *Science.* 2020; 368(6491):638–42. DOI: 10.1126/science.abb6105.

11. Метро Москвы – 85 лет. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.mos.ru/city/projects/metro85> (дата обращения 25.10.2020).
12. Метрополитен в цифрах. [Электронный ресурс]. URL: <https://mosmetro.ru/press/digits> (дата обращения 15.11.2020).
13. When to Wear Gloves. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/gloves.html> (дата обращения 07.11.2020).
14. Coronavirus disease (COVID-19): Masks. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-masks> (дата обращения 07.11.2020).
15. Chu D.K., Akl E.A., Duda S., Solo K., Yaacoub S., Schünemann H.J. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2020; 395(10242):1973–87. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31142-9.
16. Matuschek C., Moll F., Fangerau H., Fischer J.C., Zänker K., van Griensven M., Schneider M., Kindgen-Milles D., Knoefel W.T., Lichtenberg A., Tamaskovics B., Djepmo-Njanang F.J., Budach W., Corradini S., Häussinger D., Feldt T., Jensen B., Pelka R., Orth K., Peiper M., Grebe O., Maas K., Bölske E., Haussmann J. Face masks: benefits and risks during the COVID-19 crisis. *Eur. J. Med. Res.* 2020; 25(1):23. DOI: 10.1186/s40001-020-00430-5.
17. Liang M., Gao L., Cheng C., Zhou Q., Uy J.P., Heiner K., Sun C. Efficacy of face mask in preventing respiratory virus transmission: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med. Infect. Dis.* 2020; 36:101751. DOI: 10.1016/j.tmaid.2020.101751.
18. Об эффективности использования СИЗ при распространении острых респираторных вирусных инфекций. [Электронный ресурс]. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=15472 (дата обращения 20.11.2020).

References

1. Van Doremalen N., Bushmaker T., Morris D.H., Holbrook M.G., Gamble A., Williamson B.N., Tamin A., Harcourt J.L., Thornburg N.J., Gerber S.I., Lloyd-Smith J.O., De Wit E., Munster V.J. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(16):1564–7. DOI: 10.1056/NEJMc2004973.
2. Ahn J.Y., An S., Sohn Y., Cho Y., Hyun J.H., Baek Y.J., Kim M.H., Jeong S.J., Kim J.H., Ku N.S., Yeom J.-S., Smith D.M., Lee H., Yong D., Lee Y.-J., Kim J.W., Kim H.R., Hwang J., Choi J.Y. Environmental contamination in the isolation rooms of COVID-19 patients with severe pneumonia requiring mechanical ventilation or high-flow oxygen therapy. *J. Hosp. Infect.* 2020; 106(3):570–6. DOI: 10.1016/j.jhin.2020.08.014.
3. Yamagishi T., Ohnishi M., Matsunaga N., Kakimoto K., Kamiya H., Okamoto K., Suzuki M., Gu Y., Sakaguchi M., Tajima T., Takaya S., Ohmagari N., Takeda M., Matsuyama Sh., Shirato K., Nao N., Hasegawa H., Kageyama Ts., Takayama I., Saito Sh., Wada K., Fujita R., Saito H., Okinaka K., Griffith M., Parry A.E., Barnettson B., Leonard J., Wakita T. Environmental sampling for severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 during a COVID-19 outbreak on the Diamond Princess cruise ship. *J. Infect. Dis.* 2020; 222(7):1098–102. DOI: 10.1093/infdis/jiaa437.
4. Zhou Y., Zeng Y., Chen C. Presence of SARS-CoV-2 RNA in isolation ward environment 28 days after exposure. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 97:258–9. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.06.015.
5. Mizumoto K., Kagaya K., Zarebski A., Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25(10):2000180. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000180.
6. Prather K.A., Wang Ch.C., Schooley R.T. Reducing transmission of SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 368(6498):1422–4. DOI: 10.1126/science.abc6197.
7. Goscé L., Johansson A. Analysing the link between public transport use and airborne transmission: mobility and contagion in the London underground. *Environmental Health.* 2018; 17(1):84. DOI: 10.1186/s12940-018-0427-5.
8. Furuya H. Risk of transmission of airborne infection during train commute based on mathematical model. *Environ. Health Prev. Med.* 2007; 12(2):78–83. DOI: 10.1007/BF02898153.
9. Hu M., Lin H., Wang J., Xu C., Tatem A.J., Meng B., Zhang X., Liu Y., Wang P., Wu G., Xie H., Lai S. Risk of COVID-19 transmission in train passengers: an epidemiological and modeling study. *Clin. Infect. Dis.* 2021; 72(4):604–10. DOI: 10.1093/cid/ciaa1057.
10. Tian H., Liu Y., Li Y., Wu C.H., Chen B., Kraemer M.U.G., Li B., Cai J., Xu B., Yang Q., Wang B., Yang P., Cui Y., Song Y., Zheng P., Wang Q., Bjornstad O.N., Yang R., Grenfell B.T., Pybus O.G., Dye C. An investigation of transmission control measures during the first 50 days of the COVID-19 epidemic in China. *Science.* 2020; 368(6491):638–42. DOI: 10.1126/science.abb6105.

11. [Moscow Metro – 85 years old]. (Cited 25 Oct 2020). [Internet]. Available from: <https://www.mos.ru/city/projects/metro85>.
12. [Subway System in Figures]. (Cited 15 Nov 2020). [Internet]. Available from: <https://mosmetro.ru/press/digits>.
13. When to wear gloves. (Cited 07 Nov 2020). [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/gloves.html>.
14. Coronavirus disease (COVID-19): Masks. (Cited 07 Nov 2020). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-masks>.
15. Chu D.K., Akl E.A., Duda S., Solo K., Yaacoub S., Schünemann H.J. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2020; 395(10242):1973–87. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31142-9.
16. Matuschek C., Moll F., Fangerau H., Fischer J.C., Zänker K., van Griensven M., Schneider M., Kindgen-Milles D., Knoefel W.T., Lichtenberg A., Tamaskovics B., Djiepmo-Njanang F.J., Budach W., Corradini S., Häussinger D., Feldt T., Jensen B., Pelka R., Orth K., Peiper M., Grebe O., Maas K., Bölke E., Haussmann J. Face masks: benefits and risks during the COVID-19 crisis. *Eur. J. Med. Res.* 2020; 25(1):23. DOI: 10.1186/s40001-020-00430-5.
17. Liang M., Gao L., Cheng C., Zhou Q., Uy J.P., Heiner K., Sun C. Efficacy of face mask in preventing respiratory virus transmission: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med. Infect. Dis.* 2020; 36:101751. DOI: 10.1016/j.tmaid.2020.101751.
18. On the effectiveness of using PPE in the spread of acute respiratory viral infections. (Cited 20 Nov 2020). [Internet]. Available from: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=15472.

Authors:

Saifullin M.A., Kol'tsova E.A., Simonova Ya.A., Makiev E.A., Pylaeva E.Yu., Zvereva N.N. Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov. 1, Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russian Federation. E-mail: dr_saifullin@mail.ru.

Klimova E.A. First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov (Sechenov University). Building 1, 19, Bolshaya Pirogovskaya St., Moscow, 119146, Russian Federation. E-mail: kaitlinklimova@gmail.com.

Pshenichnaya N.Yu. Central Research Institute of Epidemiology. 3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russian Federation. E-mail: natalia-pshenichnyaya@yandex.ru.

Об авторах:

Сайфуллин М.А., Кольцова Е.А., Симонова Я.А., Макиев Е.А., Пылаева Е.Ю., Зверева Н.Н. Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова. Российская Федерация, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1. E-mail: dr_saifullin@mail.ru.

Климова Е.А. Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова. Российская Федерация, 119146, Москва, ул. Большая Пироговская, 19, стр. 1. E-mail: kaitlinklimova@gmail.com.

Пшеничная Н.Ю. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. Российская Федерация, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а. E-mail: natalia-pshenichnyaya@yandex.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-137-142

УДК 616.98:579.842.23

Р.Р. Салихов, С.В. Борисова, Н.Г. Авдеева, Ю.И. Самохвалова, О.А. Волох

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* В ПРОЦЕССЕ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ МАССЫ

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

Цель исследования – оптимизация условий глубинного периодического культивирования и состава питательной среды для получения клеточной массы штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*, применяемой в качестве адсорбента при производстве чумных диагностических иммуноглобулинов. **Материалы и методы.** Использовали штаммы-адсорбенты *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70, относящиеся к V, I, III, IV, V серотипам соответственно, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Процесс культивирования осуществляли на шейкере-инкубаторе, лабораторном и пилотном ферментерах с варьированием условий процесса, различными вариантами подкормок и питательных сред. **Результаты и обсуждение.** В ходе работы определены оптимальные параметры периодического глубинного культивирования. Установлено, что наибольший выход биомассы обеспечивает комбинация «питательная среда – углеродный субстрат» в виде бульона на основе ферментативного гидролизата фибрина с внесением в качестве субстратной подкормки галактозы. При этом морфология и иммунохимические свойства микробных клеток, полученных при оптимизированном процессе, не отличались от таковых при контрольном. Проведен процесс оптимизации условий получения клеточной массы *Y. pseudotuberculosis* с последующим масштабированием.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, периодическое глубинное культивирование, ферментативный гидролизат фибрина, галактоза, питательная среда, субстратная подкормка.

Корреспондирующий автор: Салихов Руслан Римович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Салихов Р.Р., Борисова С.В., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Волох О.А. Оптимизация условий культивирования *Yersinia pseudotuberculosis* в процессе получения клеточной массы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:137–142. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-137-142
Поступила 29.06.2021. Принята к публ. 02.07.2021.

R.R. Salikhov, S.V. Borisova, N.G. Avdeeva, Yu.I. Samokhvalova, O.A. Volokh

Optimization of the Conditions for Cultivation of *Yersinia pseudotuberculosis* in the Process of Obtaining Cell Mass

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

Abstract. Objective of the study was to optimize the conditions of submerged recurrent cultivation and the composition of the nutrient medium for obtaining the cell mass of *Yersinia pseudotuberculosis* strains, used as an adsorbent in the preparation of diagnostic plague immunoglobulins. **Materials and methods.** We utilized *Y. pseudotuberculosis* adsorbent strains 6; 31; 68; 69; and 70 belonging to V, I, III, IV, and V serotypes, respectively, received from the State Collection of Pathogenic Bacteria at the premises of the RusRAPI “Microbe”. The cultivation process was carried out on an incubator-shaker, laboratory and pilot fermenters with variation of the process parameters, different options for feeding and nutrient media. **Results and discussion.** In the course of work, the optimal parameters of recurring submerged cultivation have been established. It was found that the highest biomass yield is provided by a combination of a nutrient medium – a carbon substrate in the form of a broth, based on an enzymatic fibrin hydrolysate, with the addition of galactose as a substrate feeding. Thereat, the morphology and immunochemical properties of microbial cells obtained through modified preparation process do not differ from those produced in the control run. The optimization of the parameters for *Y. pseudotuberculosis* cell mass cultivation with subsequent upscaling has been performed.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, recurrent submerged cultivation, enzymatic fibrin hydrolysate, galactose, nutrient medium, substrate feeding.

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

Corresponding author: Ruslan R. Salikhov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Salikhov R.R., Borisova S.V., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I., Volokh O.A. Optimization of the Conditions for Cultivation of *Yersinia pseudotuberculosis* in the Process of Obtaining Cell Mass. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:137–142. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-137-142

Received 29.06.2021. Accepted 02.07.2021.

Salikhov R.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4980-4109>

Borisova S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3793-6526>

Volokh O. A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>

На сегодняшний день в лабораторной диагностике возбудителя чумы применяются «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные сухие» и

«Иммуноглобулины диагностические чумные адсорбированные лошадиные для реакции агглютинации на стекле» производства РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов) [1]. Одной из стадий производства имму-

ноглобулинов диагностических чумных лошадиных (ИДЧЛ) является проведение сорбции перекрестно-реагирующих антител по методу Кастеллани [2]. Данный этап проводится с использованием бактериальных клеток штаммов-адсорбентов, в частности *Yersinia pseudotuberculosis*.

В настоящее время получение биомассы *Y. pseudotuberculosis* проводят в условиях периодического глубинного культивирования с использованием среды на основе ферментативного гидролизата казеина с дозированным добавлением субстратной подкормки в виде раствора глюкозы. Одной из перспективных производственных питательных сред является среда на основе панкреатического гидролизата фибрина (ФГФ), полученного из отхода производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина, согласно патенту RU 2425866 C1 [3]. В институте «Микроб» разработаны и апробированы питательные среды на основе ФГФ для глубинного культивирования *Vibrio cholerae* и *Francisella tularensis* [4, 5]. Использование ФГФ в производственной практике получения штаммов-адсорбентов *Y. pseudotuberculosis* позволяет сократить расходы при получении клеточной массы, что в конечном итоге может значимо отразиться на себестоимости препарата. Внесение в питательную среду ряда веществ, в частности углеродного субстрата, также позволяет увеличить выход клеточной массы. Так, согласно результатам ряда авторов, использование галактозы при культивировании штаммов *Y. pseudotuberculosis* способствует активному приросту клеточной массы [6]. Исходя из вышесказанного, актуальным является подбор оптимальных сред и условий культивирования с целью увеличения выхода клеточной массы *Y. pseudotuberculosis*.

Цель данной работы – оптимизация условий культивирования и состава питательной среды для получения клеточной массы штаммов-адсорбентов *Y. pseudotuberculosis*.

Материалы и методы

В работе использовались штаммы-адсорбенты *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70, относящиеся к V, I, III, IV, V серотипам соответственно. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Сахаролитическую активность штаммов оценивали на пестром ряде Гисса с использованием различных вариантов углеродных субстратов: арабинозы, ксилозы, галактозы, глюкозы, маннозы, рамнозы, раффинозы, мальтозы, маннита, глицерина. Для оценки влияния углеродных субстратов на рост *Y. pseudotuberculosis* использовалась минимальная среда М9 [7]. В качестве полноценных экспериментальных сред применялись среды на основе: ФГФ, панкреатического гидролизата рыбной муки (ПГРМ) и панкреатического гидролизата казеина (ПГК) производства ФБУН «Государственный научный центр

прикладной микробиологии и биотехнологии» (Оболенск). Содержание аминного азота в полноценных средах доводили до 0,1 %, водородный показатель – до 7,4. В качестве плотной питательной среды использовали агар Хоттингера pH 7,2.

Для глубинного культивирования штаммов *Y. pseudotuberculosis* использовали термостатируемый шейкер-инкубатор, лабораторный и пилотный ферментеры с общими объемами 1,5 и 70 л соответственно. В условиях шейкера-инкубатора культивирование проводили на колбах Эрленмейера объемом 250 мл с внесением 25 мл среды в течение 24 ч при 130 об/мин и поддержанием температуры 28 °С. Выращивание на лабораторном и пилотном ферментерах осуществляли с автоматическим контролем ключевых параметров: температура 28 °С, содержание растворенного кислорода в культуральной жидкости поддерживали на уровне (40±5) %, pH питательной среды поддерживали добавлением 10 % раствора NaOH.

Для вариантов культивирования в условиях шейкера-инкубатора и лабораторного ферментера инокулят готовили путем смыва двухсуточной культуры с плотной среды 0,9 % раствором NaCl, посевная доза составляла 2 % от объема культивирования. Для пилотного ферментера использовали суточную бульонную культуру в размере 10 % от объема культивирования.

После окончания выращивания инактивацию культуры проводили: а) при объемах до 1 л путем нагрева культуральной жидкости до 100 °С с поддержанием заданной температуры в течение 30 мин; б) в условиях пилотного ферментера после прогрева дополнительно вносили в культуральную жидкость формалин до конечной концентрации 0,6 % с последующей экспозицией длительностью 18 ч. Осадок клеточной массы штаммов-адсорбентов отделяли центрифугированием на лабораторной центрифуге в течение 15 мин при 10000 об/мин, на проточной центрифуге – со скоростью подачи 10 л/ч при 20000 об/мин.

Концентрацию микробных клеток в культуральной жидкости определяли турбидиметрически при длине волны 540 нм. При культивировании на лабораторном ферментере рост культуры контролировали в режиме реального времени при длине волны 600 нм в проточной ячейке.

Микробиологическую чистоту культуры контролировали путем посева на плотную среду и микроскопией мазков, окрашенных по Граму. Иммунохимическую активность полученной клеточной массы контролировали следующими методами: реакция агглютинации на стекле (с применением иммуноглобулинов диагностических псевдотуберкулезных адсорбированных лошадиных для реакции агглютинации на стекле производства РосНИПЧИ «Микроб») и методом флуоресцирующих антител (с использованием иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих псевдотуберку-

лезных адсорбированных лошадиных производства РосНИПЧИ «Микроб»). Все этапы работы выполнялись в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Расчет удельной скорости роста (μ) определяли согласно общепринятой методике [8]. Статистический анализ проводили с использованием пакета Microsoft Excel 2010. Выявление статистической значимости различий результатов производили методом двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA), для апостериорного анализа применяли метод множественного сравнения Тьюки (Tukey HSD test) [9]. В качестве пограничного уровня статистической значимости принимали значение $p \leq 0,05$. Кривые линии роста культуры строили с величиной достоверности аппроксимации $R^2 \geq 0,95$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе проводили определение сахаролитической активности изучаемых штаммов. Ключевым аспектом выбора углеродного субстрата для использования в дальнейшем исследовании стала обязательная его ферментация всеми штаммами. Так, маннит не ферментировался штаммом *Y. pseudotuberculosis* 70, а раффиноза – штаммами *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 70, поэтому данные углеродные субстраты исключались из дальнейших экспериментов. Культивирование с применением остальных вариантов сахаров и спиртов показало изменение цвета индикатора среды для всех штаммов, что говорит об их успешной ферментации. Полученные результаты согласуются с данными, представленными в литературе [10, 11]. Кроме того, отмечено сильное изменение цвета индикатора в вариантах с глюкозой и маннозой для всех штаммов, что указывает на наибольшее изменение водородного показателя среды в ходе роста культуры. Использование в качестве углеродного субстрата арабинозы, ксилозы, галактозы, мальтозы, рамнозы, глицерина не показало значительного изменения pH среды.

Следующий этап работы заключался в определении влияния отобранных вариантов углеродных субстратов на конечный прирост биомассы штаммов-адсорбентов *Y. pseudotuberculosis*. Для оценки влияния углеродного субстрата с параллельным нивелированием воздействия компонентов среды на рост изучаемой культуры использовалась минимальная среда М9. Штаммы *Y. pseudotuberculosis* в условиях малообъемного культивирования выращивали в течение 24 ч в шейкере-инкубаторе на минимальной среде с добавлением соответствующего варианта субстратной подкормки до конечной концентрации 1,2 мг/мл. В качестве контроля использовалась минимальная среда без внесения субстратной подкормки. Так как при использовании в качестве субстратной подкормки маннозы, рамнозы, арабинозы, мальтозы не выявлен рост, отличный от контроля, для всех исследуемых штаммов, результаты, полученные при культивировании на данных углеродных субстратах, не принимались в расчет. На рис. 1 представлены результаты влияния различных вариантов субстратной подкормки на прирост биомассы *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70.

Значение критерия Фишера, полученное нами при использовании различных вариантов субстратных подкормок, превысило критическое значение $F_{\text{экс}} = 11,53 > F_{\text{крит}} = 3,00$, что говорит о влиянии субстратной подкормки на прирост биомассы. Степень влияния субстратной подкормки на количественный прирост биомассы оценивалась в 60,11 %. Попарные сравнения средних значений по выборкам отдельных углеродных субстратов согласно методу Тьюки показали, что варианты культивирования на различных углеродных субстратах статистически отличались от контрольного варианта. Таким образом, прирост биомассы относительно контроля составил для ксилозы ($44,0 \pm 8,81$ %), галактозы – ($48,0 \pm 5,4$ %), глюкозы и глицерина – ($50,0 \pm 5,0$) и ($32,4 \pm 9,5$) % соответственно. Вариант штамма не оказывал статистически значимого влияния на прирост биомассы.

Следующий этап исследования заключался в подборе полноценной питательной среды для максимального прироста биомассы штаммов

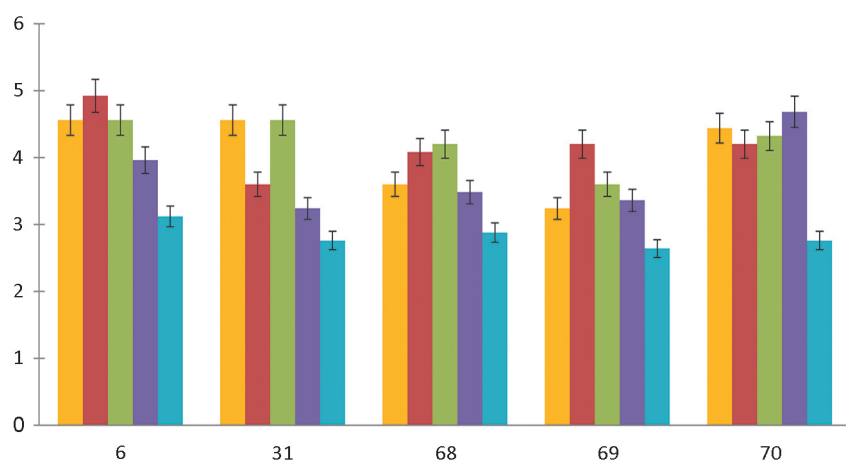


Рис. 1. Влияние углеродного субстрата на прирост биомассы штаммов *Y. pseudotuberculosis* при культивировании на минимальной среде в условиях шейкера-инкубатора:

Цветом столбца обозначен вариант углеродного субстрата: желтый – ксилоза, красный – галактоза, зеленый – глюкоза, фиолетовый – глицерин, синий – контроль. Ось ординат: концентрация $\times 10^9$ м.к./мл. Ось абсцисс: культивируемые штаммы *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70

Fig. 1. Effect of the carbon substrate on the biomass growth of *Y. pseudotuberculosis* strains when cultivated on a minimal medium in a shaker-incubator:

The color of the column indicates the variant of the carbon substrate: yellow – xylose, red – galactose, green – glucose, violet – glycerin, blue – control. Y-axis: concentration $\times 10^9$ m.c./ml. X-axis: cultivated strains of *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70

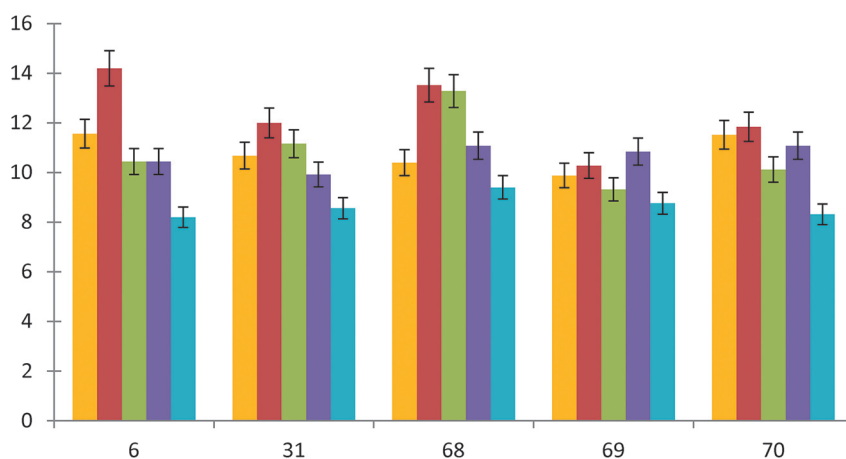


Рис. 2. Влияние углеродного субстрата на прирост биомассы штаммов *Y. pseudotuberculosis* при культивировании на питательной среде на основе ФГФ в условиях шейкера-инкубатора:

Цветом столбца обозначен вариант углеродного субстрата: желтый – ксилоза, красный – галактоза, зеленый – глюкоза, фиолетовый – глицерин, синий – контроль. Ось ординат: концентрация × 10⁹ м.к./мл. Ось абсцисс: культивируемые штаммы *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70

Fig. 2. Effect of carbon substrate on biomass growth of *Y. pseudotuberculosis* strains during cultivation on a nutrient medium based on enzymatic fibrin hydrolyzate under shaker-incubator conditions:

The color of the column indicates the variant of the carbon substrate: yellow – xylose, red – galactose, green – glucose, violet – glycerin, blue – control. Y-axis: concentration × 10⁹ m.c./ml. X-axis: cultivated strains of *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70

Y. pseudotuberculosis. Культивирование проводилось качалочным методом, по аналогии с предыдущим этапом. Исследовались два варианта полноценных питательных сред на основе ПГРМ и ФГФ. Среда на основе ПГК принята в качестве контрольной. Согласно полученным результатам, тип полноценной питательной среды оказывал статистически значимое влияние на прирост биомассы, $F_{\text{эксп}} = 16,15 > F_{\text{крит.}} = 4,46$. Степень влияния фактора составила 65,05 %. Как и на предыдущем этапе, вариант штамма не оказывал статистически значимого влияния на увеличение концентрации микробных клеток штаммов-адсорбентов. Применение в качестве полноценных питательных сред ПГРМ и ФГФ дает больший прирост биомассы, чем культивирование на ПГК. ПГРМ показал средний прирост биомассы относительно контроля ($10,20 \pm 6,48$ %), а ФГФ – ($26,14 \pm 1,95$ %). Полученные данные указывают на то, что наиболее перспективной полноценной питательной средой для наработки бактериальной массы штаммов *Y. pseudotuberculosis* является ФГФ.

Опираясь на полученные результаты, проводили эксперимент по культивированию на среде ФГФ с внесением различных вариантов углеродных субстратов. В качестве контроля использовали ФГФ без внесения субстратной подкормки. Результаты представлены на рис. 2.

При культивировании на ФГФ внесение углеродного субстрата оказывало статистически значимое влияние на прирост биомассы, $F_{\text{эксп}} = 9,76 > F_{\text{крит.}} = 3,00$. Степень влияния типа субстратной подкормки на прирост биомассы составила 60,97 %, что аналогично результату, полученному при внесении углеродного субстрата на минимальной среде. Это указывает на отсутствие межфакторного взаимодействия по типу «среда – углеродный субстрат». Средний прирост биомассы относительно контроля составил для ксилозы ($25,5 \pm 6,3$ %), галактозы – ($43,4 \pm 8,9$ %), глюкозы и глицерина – ($25,3 \pm 5,7$) и ($23,6 \pm 3,2$) % соответственно.

С целью анализа влияния субстратной подкормки на кинетику роста *Y. pseudotuberculosis* проводили культивирование в условиях лабораторного ферментера. Так как в ходе предыдущих исследований установлено, что вариант штамма не влияет на прирост биомассы, в качестве модельного объекта в дальнейшей работе использовали *Y. pseudotuberculosis* 68. Высокая схожесть штаммов *Y. pseudotuberculosis* подтверждается литературными данными [10, 11]. Исследуемые образцы: ФГФ + субстратная подкормка, контроль – ФГФ. Субстратную подкормку вносили дозированно со второго по шестой час культивирования. Результаты культивирования представлены на рис. 3.

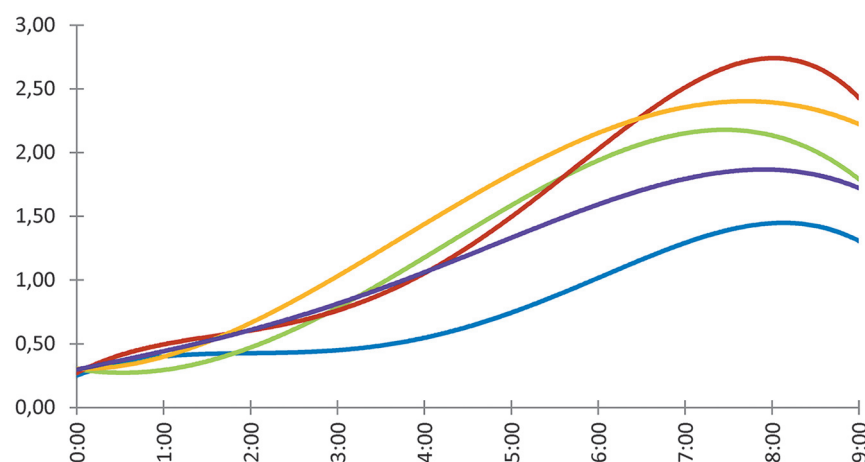


Рис. 3. Влияние углеродного субстрата на динамику роста *Y. pseudotuberculosis* 68 при культивировании в условиях лабораторного ферментера на питательной среде на основе ФГФ:

Цветом кривой обозначен вариант углеродного субстрата: желтый – ксилоза, красный – галактоза, зеленый – глюкоза, фиолетовый – глицерин, синий – контроль. Ось ординат: значения оптической плотности 600 нм. Ось абсцисс: время от начала культивирования, чч:мм

Fig. 3. Impact of carbon substrate on the dynamics of growth of *Y. pseudotuberculosis* 68 when cultivated in a laboratory fermenter on a nutrient medium based on enzymatic fibrin hydrolyzate:

The color of the curve indicates the variant of the carbon substrate: yellow – xylose, red – galactose, green – glucose, violet – glycerin, blue – control. Y-axis: absorbance values of 600 nm. X-axis: elapsed time from the beginning of cultivation, hh:mm

Культивирование осуществляли до момента выхода на стационарную фазу, которую обнаруживали по скачкообразному изменению оптической плотности микробной суспензии.

Наибольший конечный прирост биомассы относительно контроля отмечен в варианте культивирования с галактозой – $(62,2 \pm 8,4) \%$. Схожие результаты получены при культивировании с использованием в качестве углеродного субстрата ксилозы, прирост составил $(49,9 \pm 5,1) \%$. Внесение глюкозы и глицерина в культуральную среду обеспечило относительно равные показатели прироста микробной биомассы – $(20,1 \pm 6,0)$ и $(15,7 \pm 3,4) \%$ соответственно.

Длительность лаг-фазы во всех вариантах оказалась приблизительно одинаковой ($\approx 1,5$ ч от момента начала культивирования). Большой конечный прирост биомассы при дозированном внесении раствора галактозы, по-видимому, связан с продолжительной (≈ 7 ч) фазой экспоненциального роста, в то время как использование других углеродных субстратов отличалось меньшей длительностью ($\approx 5,5$ ч) аналогичной фазы.

Темпы прироста биомассы в период экспоненциальной фазы при внесении углеродных субстратов были выше, чем в контрольном варианте. Удельная скорость роста в экспоненциальной фазе при использовании в качестве углеродных субстратов галактозы, глюкозы, ксилозы, глицерина составила $(0,34 \pm 0,02)$, $(0,35 \pm 0,02)$, $(0,32 \pm 0,02)$, $(0,21 \pm 0,06) \text{ ч}^{-1}$ соответственно. Удельная скорость роста в контрольном варианте – $(0,19 \pm 0,02) \text{ ч}^{-1}$.

При масштабировании процесса получения штаммов-адсорбентов выход за пределы оптимальных значений водородного показателя среды может значительно ингибировать процесс роста культуры, что негативным образом сказывается на конечном выходе продукта. Кроме того, согласно литературным данным, при значительных сдвигах pH среды возможно изменение антигенного состава клетки [8]. В свою очередь изменение антигенного состава микроорганизма недопустимо при получении штаммов-адсорбентов. Оптимальные значения концентрации водородных ионов для размноже-

ния *Y. pseudotuberculosis* лежат в диапазоне pH 6,6–7,8 [11]. В процессе периодического глубинного культивирования отмечено изменение значения pH, которое зависело от типа субстратной подкормки. Так, добавление глюкозы в культуральную жидкость приводило к постепенному снижению значения водородного показателя, вплоть до экстремальных ($< 6,0$ pH) значений. При использовании в качестве субстратной подкормки глицерина pH снижался до $(6,6 \pm 0,05)$. При внесении галактозы и ксилозы через 1 ч после начала подкормки происходило слабое снижение pH до $(7,1 \pm 0,05)$, затем водородный показатель среды повышался до $(7,8 \pm 0,05)$, чему соответствовал активный прирост биомассы.

В условиях глубинного культивирования аэробных микроорганизмов большое значение приобретает поддержание оптимальной концентрации растворенного кислорода в среде. В ходе работы эмпирическим путем установлено, что оптимальный уровень содержания растворенного кислорода в среде составляет $(40 \pm 5) \%$. Поддержание более высоких значений кислорода в среде связано со значительным увеличением числа оборотов мешалки и степени аэрирования, что приводит к сильному пенообразованию. Кроме того, высокая насыщенность кислородом приводит к ингибированию роста культуры, что, вероятно, связано с накоплением перекисных соединений клетками [8].

На основе полученных результатов проведения масштабирования процессов культивирования штаммов-адсорбентов *Y. pseudotuberculosis*. Применялись следующие комбинации питательных сред и углеродных субстратов: оптимизированный вариант – ферментативный гидролизат фибрина с внесением галактозы (ФГФ+галактоза), контрольный вариант (применяемый в производственном цикле) – панкреатический гидролизат казеина с внесением глюкозы (ПГК+глюкоза). В качестве модельного штамма использован *Y. pseudotuberculosis* 68. Культивирование проводили на пилотном ферментере с поддержанием уровня кислорода $(40 \pm 5) \%$, pH $(7,2 \pm 0,2)$, при температуре 28°C до момента выхода на стационарную фазу. Кривые роста представлены на рис. 4.

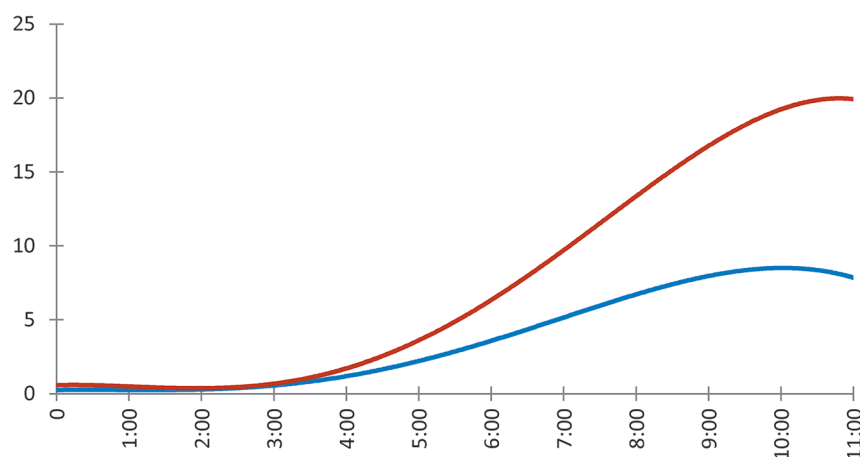


Рис. 4. Влияние варианта среда + углеродный субстрат на динамику роста *Y. pseudotuberculosis* 68 при культивировании в условиях пилотного ферментера:

Цветом кривой обозначен вариант питательной среды + углеродный субстрат: *красный* – ФГФ+галактоза, *синий* – ПГК+глюкоза. Ось ординат: концентрация $\times 10^9$ м.к./мл. Ось абсцисс: время от начала культивирования, чч:мм

Fig. 4. Impact of the medium + carbon substrate option on the growth dynamics of *Y. pseudotuberculosis* 68 when cultivated under the conditions of a pilot fermenter:

The color of the curve indicates the variant of the nutrient medium + carbon substrate: *red* – enzymatic hydrolysate of fibrin + galactose, *blue* – pancreatic hydrolysate of casein + glucose. Y-axis: concentration $\times 10^9$ mc/ml. X-axis: elapsed time from the beginning of cultivation, hh:mm

Прирост биомассы при выращивании на гидролизате фибрина с внесением галактозы выше контрольного варианта на $(0,65 \pm 0,05) \text{ ч}^{-1}$. Лаг-фаза и в первом, и во втором варианте культивирования была равной по длительности ($\approx 4,5 \text{ ч}$). Фаза экспоненциального роста в контрольном варианте была менее продолжительной ($\approx 4,5 \text{ ч}$), чем в оптимизированном варианте ($\approx 5,5 \text{ ч}$). Удельная скорость роста в данные временные промежутки составила $(0,26 \pm 0,01)$ и $(0,33 \pm 0,01) \text{ ч}^{-1}$ соответственно. Выход клеточной массы на единицу объема среды составил $(5,25 \pm 0,24) \text{ мг/мл}$ для контроля и $(15,13 \pm 0,19) \text{ мг/мл}$ для оптимизированного варианта. Морфология и иммунохимические свойства микробных клеток, полученных при оптимизированном и контрольном процессах, не различались между собой.

Таким образом, для увеличения выхода клеточной массы штаммов *Y. pseudotuberculosis*, используемых для получения чумных диагностических иммуноглобулинов, экспериментально доказана возможность применения питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина с внесением в качестве субстратной подкормки галактозы.

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

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
2. Castellani A. Die Agglutination bei gemischter Infektion und die Diagnose der letzteren. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*. 1902; 40:1–19.
3. Антонычева М.В., Нижегородцев С.А., Еремин С.А., Аленкина Т.В., Шульгина И.В., Вахрушина Н.И., Белоусов А.Д., Жулидов И.М., Никифоров А.К. Питательная среда для глубинного культивирования холерного вибриона. Патент РФ № 2425866, опублик. 10.08.2011. Бюл. № 24.
4. Никифоров А.К., Антонычева М.В., Волох О.А., Еремин С.А., Киреев М.Н., Жулидов И.М., Алешина Ю.А., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Холматов К.И. Разработка питательных сред на основе непищевого сырья для глубинного культивирования штаммов холерного вибриона. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 1:85–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-1-85-88.
5. Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Кузнецова Е.М., Холматов К.И., Бибиков Д.Н., Никифоров А.К. Жидкая питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 2:81–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-81-83.
6. Бахолдина С.И., Шубин Ф.Н., Исаева М.П., Ракин А.В., Соловьева Т.Ф. Галактоза способствует размножению бактерий псевдотуберкулеза в условиях *in vitro* и *in vivo*. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2010; 4:16–9.
7. Дятлов И.А., Кутырев В.В., Храмов М.В. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы. М.: 2012. 415 с.
8. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир; 1978. 331 с.
9. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников. М.: Физматлит; 2006. 816 с.
10. Туманский В.М. Псевдотуберкулез. М.: Медгиз; 1958. 82 с.
11. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М.: Медицина; 2001. 256 с.

References

1. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: CJSC "Shiko"; 2013. 560 p.
2. Castellani A. Die Agglutination bei gemischter Infektion und die Diagnose der letzteren. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*. 1902; 40:1–19.
3. Antonycheva M.V., Nizhegorodtsev S.A., Eremin S.A., Alenkina T.V., Shul'gina I.V., Vakhrushina N.I., Belousov A.D., Zhulidov I.M., Nikiforov A. K. [Nutrient medium for the cultivation of *Vibrio cholerae*]. RF patent No. 2425866, publ. 10.08.11. Bul. No. 24.
4. Nikiforov A.K., Antonycheva M.V., Volokh O.A., Eremin S.A., Kireev M.N., Zhulidov I.M., Aleshina Yu.A., Avdeeva N.G., Vakhrushina N.I., Kholmato V.K.I. [Development of nutrient media based on non-food raw materials for submerged cultivation of *Vibrio cholerae* strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (1):85–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-1-85-88.
5. Volokh O.A., Antonycheva M.V., Avdeeva N.G., Kuznetsova E.M., Kholmato V.K.I., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. [Liquid nutrient medium for submerged cultivation of the tularemia microbe]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (2):81–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-81-83.
6. Bakholdina S.I., Shubin F.N., Isaeva M.P., Rakin A.V., Solov'eva T.F. [Galactose facilitates the propagation of pseudotuberculosis bacteria *in vitro* and *in vivo*]. *Tikhookeansky Meditsinsky Zhurnal [Pacific Medical Journal]*. 2010; 4:16–9.
7. Dyatlov I.A., Kutyrev V.V., Khramov M.V. [Nutrient Media for Isolation, Cultivation and Identification of Pathogens of Particularly Dangerous Infections of Bacterial Nature]. Moscow; 2012. 415 p.
8. Perth S.J. [Fundamentals of Cultivation of Microorganisms and Cells]. Moscow: "Mir"; 1978. 331 p.
9. Kobzar' A.I. [Applied Mathematical Statistics. For engineers and scientists]. Moscow: "Fizmatlit"; 2006. 816 p.
10. Tumansky V.M. [Pseudotuberculosis]. Moscow: "Medgiz"; 1958. 82 p.
11. Somov G.P., Pokrovsky V.I., Besednova N.N., Antonenko F.F. [Pseudotuberculosis]. Moscow: "Meditsina"; 2001. 256 p.

Authors:

Salikhov R.R., Borisova S.V., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I., Volokh O.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Салихов Р.Р., Борисова С.В., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Волох О.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-143-149

УДК 616.98:578.833.2

А.В. Семенова¹, Г.Ф. Сиволобова¹, А.А. Гражданцева¹, С.А. Пьянков¹, И.С. Шульгина^{1,2},
О.С. Таранов¹, О.В. Пьянков¹, Д.В. Антонен¹, Л.И. Карпенко¹, Е.В. Старостина¹, М.Б. Боргоякова¹,
А.Н. Чикаев³, Е.В. Гаврилова¹, Р.А. Максютлов¹, Г.В. Кочнева¹

ИММУНОГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО КАСSETу ГЕНОВ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА МАРБУРГ

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск, Российская Федерация;

³ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Российская Федерация

Цель исследования – создание высокоиммуногенной вакцинной конструкции на основе рекомбинантного варианта репликативно-дефектного штамма вируса осповакцины MVA, экспрессирующего вирусоподобные частицы, имитирующие природную инфекцию вирусом Марбург. **Материалы и методы.** Рекомбинантный вирус получали путем рекомбинации между гомологичными последовательностями вирусной ДНК и инсерционной плазмиды pDel2-GP-VP-Pat, которая несет трансгены структурных белков GP и VP40 вируса Марбург, фланкированные фрагментами генома штамма MVA. Структуру рекомбинантного вируса подтверждали методами ПЦР и секвенирования, экспрессию трансгенов анализировали методом Вестерн-блот, формирование вирусоподобных частиц фиксировали с помощью электронной микроскопии. Оценку иммуногенности и протективности проводили на модели морских свинок. Титр антител определяли в иммуноферментном анализе. Для оценки Т-клеточного ответа использовали метод внутриклеточного окрашивания цитокинов с последующим анализом образцов на проточном цитофлуориметре. **Результаты и обсуждение.** На основе высокоаттенуированного штамма MVA вируса осповакцины сконструирован рекомбинантный вариант MVA-GP-VP40-MARV, несущий в районе делеции II генома кассету трансгенов GP и VP40 вируса Марбург. Показана экспрессия трансгенов в пермиссивных для MVA клетках CER, инфицированных рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-MARV, и секреция белков GP и VP40 вируса Марбург в культуральную среду. Электронно-микроскопический анализ выявил наличие вирусоподобных частиц вируса Марбург в культуральной среде клеток начиная с 12 часов после инфицирования. Двукратная вакцинация морских свинок рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-MARV в дозе 10⁸ БОЕ/животное индуцировала формирование антител к вирусу Марбург и вирусу осповакцины, а также 100 % защиту от летальной инфекции вирусом Марбург (50 ЛД₅₀). С использованием оригинального программного обеспечения TEpredict предсказана структура Т-хелперных эпитопов белка GP вируса Марбург. С помощью метода ICS экспериментально подтверждена биологическая активность этих эпитопов и показано, что они обеспечивают индукцию Т-клеточного иммунного ответа в составе вакцинной конструкции MVA-GP-VP40-MARV.

Ключевые слова: штамм MVA вируса осповакцины, вирусоподобные частицы (ВПЧ), вирус Марбург (MARV), поверхностный гликопротеин (GP), вирионный белок VP40, внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS).

Корреспондирующий автор: Семенова Анастасия Викторовна, e-mail: tkacheva_av@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Семенова А.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Пьянков С.А., Шульгина И.С., Таранов О.С., Пьянков О.В., Антонен Д.В., Карпенко Л.И., Старостина Е.В., Боргоякова М.Б., Чикаев А.Н., Гаврилова Е.В., Максютлов Р.А., Кочнева Г.В. Иммуногенные и протективные свойства рекомбинантного штамма вируса осповакцины, экспрессирующего кассету генов структурных белков вируса Марбург. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:143–149. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-143-149

Поступила 26.05.2021. Отправлена на доработку 02.06.2021. Принята к публ. 26.07.2021.

A.V. Semenova¹, G.F. Sivolobova¹, A.A. Grazhdantseva¹, S.A. P'yankov¹, I.S. Shul'gina^{1,2},
O.S. Taranov¹, O.V. P'yankov¹, D.V. Antonets¹, L.I. Karpenko¹, E.V. Starostina¹, M.B. Borgoyakova¹,
A.N. Chikaev³, E.V. Gavrilova¹, R.A. Maksyutov¹, G.V. Kochneva¹

Immunogenic and Protective Features of the Recombinant Vaccinia Virus Strain Expressing Cassette of Genes of Marburg Virus Structural Proteins

¹State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tovo, Russian Federation;

²Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russian Federation;

³Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to create a highly immunogenic vaccine construct based on a recombinant variant of a replication-defective MVA strain of vaccinia virus, expressing virus-like particles that mimic natural infection with Marburg virus. **Materials and methods.** The recombinant virus was obtained through recombination between homologous viral DNA sequences and the insertion plasmid pDel2-GP-VP-Pat which carries transgenes of the structural proteins GP and VP40 of Marburg virus, flanked by fragments of MVA strain genome. Structure of the recombinant virus was confirmed in PCR and using sequencing, transgenes expression was analyzed by Western blotting, virus-like particles formation was recorded using electron microscopy. Evaluation of immunogenicity and protectivity was carried out using a guinea pig model. The antibody titer was determined in enzyme-linked immunosorbent assay. To assess T-cell response, the intracellular staining of cytokines was used, followed by analysis of samples on a flow cytometer. **Results and discussion.** On the basis of highly attenuated MVA strain of vaccinia virus a recombinant variant

MVA-GP-VP40-MARV has been constructed, carrying a cassette of transgenes, GP and VP40, of Marburg virus in the region of deletion II of the genome. The expression of transgenes in MVA-permissive CER cells infected with recombinant MVA-GP-VP40-MARV strain and secretion of GP and VP40 proteins into culture medium have been demonstrated. Electron microscopy analysis has revealed the presence of Marburg virus-like particles in the culture medium of cells 12 hours after infection. Double vaccination of guinea pigs with MVA-GP-VP40-MARV strain at a dose of 10^8 PFU/animal induced the formation of antibodies to Marburg and vaccinia viruses, as well as 100 % protection against lethal Marburg virus infection (50 LD_{50}). Using original TEpredict software, the structure of T-helper epitopes of GP protein has been predicted. Using the ICS method, the biological activity of these epitopes has been experimentally confirmed and it was shown that they provide the induction of a T-cell immune response as part of the MVA-GP-VP40-MARV vaccine construct.

Key words: MVA strain of vaccinia virus, virus-like particles (VLP), Marburg virus (MARV), surface glycoprotein (GP), virion protein VP40, intracellular cytokine staining (ICS).

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

Corresponding author: Anastasiya V. Semenova, e-mail: tkacheva_av@vector.nsc.ru.

Citation: Semenova A.V., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., P'yankov S.A., Shul'gina I.S., Taranov O.S., P'yankov O.V., Antonets D.V., Karpenko L.I., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Chikaev A.N., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Kochneva G.V. Immunogenic and Protective Features of the Recombinant Vaccinia Virus Strain Expressing Cassette of Genes of Marburg Virus Structural Proteins. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:143–149. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-143-149

Received 26.05.2021. Revised 02.06.2021. Accepted 26.07.2021.

Semenova A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7767-0537>
Sivolobova G.F., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8362-0314>
Grazhdantseva A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7712-3699>
P'yankov S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6593-6614>
Shul'gina I.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6850-338X>
Taranov O.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
P'yankov O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>
Antonets D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1823-9701>

Karpenko L.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4365-8809>
Starostina E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1733-9524>
Borgoyakova M.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0768-1561>
Chikaev A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5423-3457>
Gavrilova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7118-5749>
Maksyutov R.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1314-281X>
Kochneva G.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2420-0483>

Проблема создания эффективных вакцин против особо опасных филовиральных инфекций, к которым относится вирус Марбург (Marburg virus, MARV), остается нерешенной в настоящее время. Перспективную вакцинную платформу представляет использование безопасного вирусного вектора, экспрессирующего непатогенные вирусоподобные частицы (ВПЧ), имитирующие вирионы вируса Марбург. Такая платформа широко используется за рубежом, в том числе и при разработке вакцин против инфекций, вызываемых вирусами Эбола [1] и Марбург [2].

В качестве высокоперспективного вируса-вектора мы предлагаем использовать штамм MVA вируса осповакцины (VACV), который является репликативно-дефектным штаммом для клеток человека. На различных доклинических моделях показано, что векторные вакцины на основе рекомбинантных штаммов MVA являются безопасными, высокоиммуногенными и обладают хорошими защитными свойствами [3].

Для продукции ВПЧ вируса Марбург в составе рекомбинантного вируса осповакцины (штамм MVA) необходимо произвести вставку в вирусный геном кассеты из генов нескольких структурных белков MARV. Основную роль в формировании ВПЧ играет матриксный вирионный белок VP40 MARV, который обладает способностью к самосборке и почкованию на мембране клетки [4]. Включение в ВПЧ поверхностного гликопротеина GP MARV является обязательным условием, поскольку он несет основные протективно значимые детерминанты вируса. Возможно также включение в состав экспрессируемой кассеты гена нуклеопротеина NP MARV, кото-

рый выполняет роль внутреннего каркаса (кора), однако данные о его роли в сборке ВПЧ носят противоречивый характер [5].

Целью настоящего исследования являлось создание высокоиммуногенной вакцинной конструкции на основе репликативно-дефектного штамма вируса осповакцины MVA, экспрессирующего вирусоподобные частицы, имитирующие природную инфекцию вирусом Марбург. Для реализации этой цели сконструирован рекомбинантный вариант MVA со встройкой кассеты генов GP-VP40 MARV и показана его 100 % протективность в отношении летальной инфекции морских свинок вирусом Марбург.

Материалы и методы

Штамм MVA получен из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, где он депонирован под номером V-713. Геномная последовательность музейного штамма MVA соответствует депонированной в GenBank под номером AY603355.1. Нами разработана система культивирования штамма MVA в клетках CER из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, которые являются гибридом клеток почки сирийского хомячка и куриных фибробластов.

Для определения концентрации (титра) вируса использовали метод бляшек. Бляшки получали на инфицированном монослое клеток CER, выращенном на 12-луночных культуральных планшетах. Визуализацию бляшек проводили раствором кристаллического фиолетового (2 г/л кристаллический

фиолетовый, 5 % формальдегид, 10 % этанол). Титр вируса выражали как количество бляшкообразующих единиц на 1 мл суспензии (БОЕ/мл).

Модифицированный штамм MVA-GP-VP40-MARV получали путем рекомбинации между гомологичными последовательностями исходного штамма MVA и инсерционной плазмиды pDel2-GP-VP-Pat. Отбор рекомбинантных вариантов вируса проводили методом временной доминантной селекции. Ген устойчивости к пуромицину *pat* использовали в качестве селективного маркера [6].

Инсерционную плазмиду pDel2-GP-VP-Pat получали на базе плазмиды pDel2-Pat [6]. Ген, кодирующий GP MARV, синтезировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием в качестве матрицы кДНК вируса Марбург и пары праймеров с заложенными в их структуру сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции *AscI* и *PmeI* для клонирования в pDel2-Pat под контроль ранне-позднего синтетического промотора вируса осповакцины PE/L. Ген, кодирующий белок VP40 MARV, получали также методом ПЦР с использованием пары праймеров, которые содержат сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *BamHI* и *EcoRI*, что обеспечивает встройку гена VP40 MARV в плазмиду pXJP5.2 под контроль природного промотора P7,5 VACV [7]. Полученный оперон P7,5-VP40 MARV на втором этапе конструирования переносили в плазмиду pDel2-Pat с использованием эндонуклеаз рестрикции *EcoRV* и *NotI*.

Отбор рекомбинантных штаммов проводили ПЦР-анализом ДНК клонов с использованием пар праймеров, специфичных к участкам генома MVA, фланкирующим район встройки (делеция II): MVA_F1 5'-CATGCTACTACCTTCGGGTAAG и MVA_R7 5'-TGCGTCTAGTATGTACGTTGTT [6]. После двойного реклонирования проводили верификацию структуры ДНК рекомбинантного штамма с помощью технологии секвенирования нового поколения (NGS) на платформе MiSEQ.

Экспрессию клонированных трансгенов в рекомбинантном варианте вируса Марбург оценивали методом Вестерн-блот. Для выявления GP MARV использовали коммерческие антитела, полученные на усеченный рекомбинантный белок (без трансмембранного домена) вируса Марбург (IBT Bioservices 0303-007). В качестве положительного контроля использовали recombinant MMARV GPdTM (IBT Bioservices 0503-001). Для иммунодетекции белка VP40 использована поликлональная анти-VP40 сыворотка мыши и рекомбинантный белок VP40 MARV, полученный в клетках *Escherichia coli* (любезно предоставлены Д.Н. Щербаковым).

Для подтверждения формирования ВПЧ вируса Марбург, продуцируемых штаммом MVA-GP-VP40-MARV, проведен электронно-микроскопический анализ. Монослой клеток CER инфицировали рекомбинантным и исходным штаммами MVA с множественностью 0,02 БОЕ/клетка. Инкубировали 12 ча-

сов, культуральную среду собирали и концентрировали ее с использованием Centrifugal Filter Units (Millipore) Ultracel-100K до уменьшения объема в 10 раз. Материал фиксировали добавлением равного объема 8 % раствора параформальдегида и наносили на медные сеточки, покрытые пленкой-подложкой из формвара и стабилизированные углеродом. Препараты дополнительно окрашивали 1 или 2 % водным раствором уранилацетата по общепринятой методике [8]. Образцы исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Фотосъемка проводилась цифровой камерой Veleta (SIS, Германия). Анализ и обработка изображения осуществлялись с помощью программного пакета iTEM (SIS, Германия) [8].

Определение иммуногенности и протективности полученного штамма MVA-GP-VP40-MARV проводили на аутбредных морских свинках массой 200–250 г из питомника лабораторных животных ГНЦ ВБ «Вектор». Все эксперименты на животных проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с протоколами, утвержденными Биоэтическим комитетом ГНЦ ВБ «Вектор». Морских свинок иммунизировали рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-MARV внутримышечно в дозе 10^8 БОЕ/животное дважды с интервалом в четыре недели. Для оценки протективности животных через четыре недели после второй иммунизации инфицировали вирусом Марбург в дозе 50 ЛД₅₀ (ЛД₅₀ – доза, летальная для 50 % тест-животных). Инфицированных животных наблюдали в течение 24 дней.

Титр антител к вирусу Марбург и вирусу осповакцины определяли в сыворотках крови иммунизированных морских свинок методом непрямого двухстадийного иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве антигена-сорбента использовали цельновирионные препараты MARV и VACV, очищенные центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Детекцию иммунных комплексов «антиген-IgG» осуществляли пероксидазным конъюгатом антител кролика против IgG морской свинки и визуализацией тетраметилбензидином (ТМБ) в цитрат-фосфатном растворе с перекисью водорода. Забор крови из сердца морских свинок осуществляли после премедикации раствором золетила (Valdepharm, Франция) через четыре недели после второй иммунизации.

Оценку клеточного иммунитета проводили через три недели после второй иммунизации [9]. Для оценки Т-клеточного ответа использовали метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (intracellular cytokine staining, ICS), который проводили в соответствии со стандартным протоколом, как описано в [10]. В качестве источника Т-клеток использовали спленоциты, полученные стандартным методом из селезенок морских свинок [9], а в качестве индикаторного цитокина – интерферон-гамма (ИФН γ). Стимуляцию спленоцитов проводили смесью синтетических пептидов, представляющих потенциаль-

ные CD4⁺ Т-клеточные эпитопы белков GP и VP40 вируса Марбург. Предсказание эпитопов проводили с использованием программного обеспечения TEpredict [10]. Пептиды синтезированы в Elabscience Biotechnology Co., Ltd (Wuhan, Китай), чистота $\geq 90,0\%$. В работе использовали девять пептидов, четыре из которых представляют Т-хелперные эпитопы белка VP40 MARV, а пять – белка GP MARV. Для стимуляции спленоцитов пептиды объединили в две группы, соответствующие белкам VP40 и GP, и добавляли в концентрации 20 мкг/мл каждого пептида на 10^6 клеток. После стимуляции клетки окрашивали моноклональными антителами PEAnti-guinea pig CD4 (MA1-81852, ThermoFisher Scientific) и PF647P Anti-guinea pig IFN-gamma (MT4A27, MabtechAB). Образцы анализировали на проточном цитометре FACSCanto II (Becton Dickinson and Company, США) с использованием программного обеспечения Everest.

Результаты и обсуждение

Для получения рекомбинантного штамма MVA сконструирована базовая плаزمиды интеграции pDel2-GP-VP-Pat, обеспечивающая вставку трансгенов в район делеции II генома MVA, не существенный для репродукции вируса. Плазмиды pDel2-GP-VP-Pat содержит последовательности,

фланкирующие район делеции II MVA, между которыми расположены высокоэффективные ранне-поздние промоторы VACV и полилинкер для встройки трансгенов. Также в плазмиду pDel2-GP-VP-Pat дополнительно введен доминантный селективный маркер для получения рекомбинантных вирусов – ген устойчивости к пуромину *pat* под контролем промотора VACV [6].

Схема генома сконструированного рекомбинантного штамма MVA со встройкой кассеты генов GP-VP40-MARV представлена на рис. 1, А. Секвенирование ДНК штамма MVA-GP-VP40-MARV показало, что в районе встройки кассеты GP-VP40-MARV имеется делеция С-концевой части гена GP (129 п.н.), которая включает трансмембранный домен белка (90 п.н.) и цитоплазматический «хвост» (24 п.н.). В результате этой делеции сдвига рамки трансляции не произошло, а новый стоп-кодон образовался через восемь аминокислот от начала делетированного участка.

Результаты Вестерн-блот-анализа представлены на рис. 1, В. Анализ экспрессии трансгенов проводили в перmissive для MVA культуре клеток CER. Как следует из рисунка, в культуральной среде инфицированных рекомбинантным штаммом клеток выявляется зрелая форма GP в виде двух расщепленных полипептидов GP1 массой 160 кДа и GP2 – 38 кДа. В лизатах инфицированных клеток выявля-

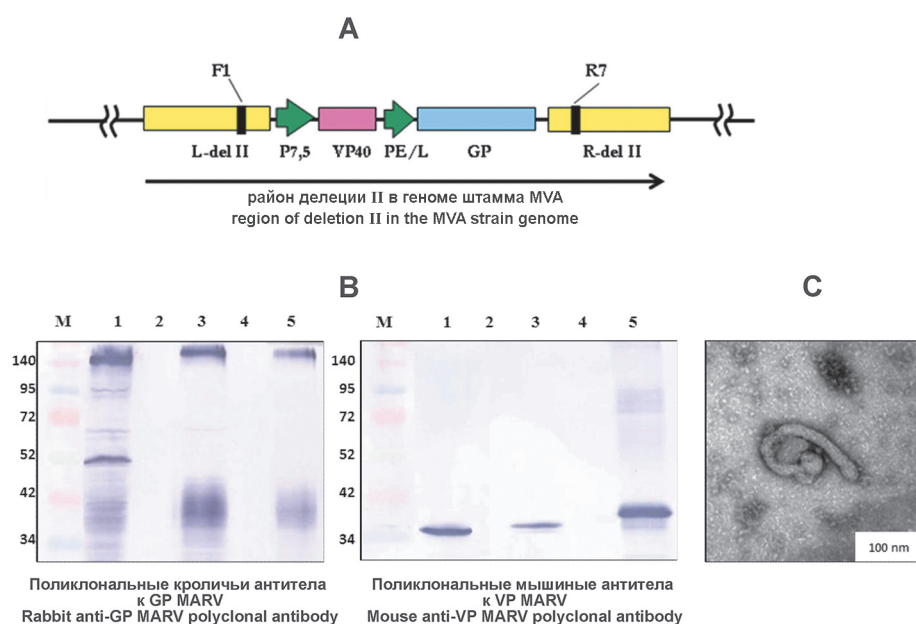


Рис. 1. Характеристики рекомбинантного штамма MVA-GP-VP40-MARV:

A – схема генома штамма MVA-GP-VP40-MARV, на которой указаны позиции праймеров, использованных в ПЦР-анализе. **B** – Вестерн-блот-анализ экспрессии кассеты генов GP-VP40 MARV в составе рекомбинантного MVA: *M* – контроль молекулярных весов Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, 26634); 1 – лизат клеток CER, инфицированных MVA-GP-VP40-MARV; 2 – лизат клеток CER, инфицированных MVA; 3 – культуральная среда клеток CER, инфицированных MVA-GP-VP40-MARV; 4 – культуральная среда клеток CER, инфицированных MVA; 5 – положительные контроли GP (слева) и VP40 (справа). **C** – электронно-микроскопический анализ ВПЧ в культуральной среде клеток CER, инфицированных рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-MARV

Fig. 1. Characteristics of the recombinant strain MVA-GP-VP40-MARV:

A – the genome of MVA-GP-VP40-MARV with the positions of the primers used in PCR analysis of recombinant viral DNA; **B** – Western blot analysis of GP-VP40 MARV gene cassette expression in recombinant MVA: *M* – control of molecular weights Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, 26634); 1 – cell lysates infected with MVA-GP-VP40-MARV; 2 – cell lysates infected with MVA; 3 – culture medium of CER cells infected with MVA-GP-VP40-MARV; 4 – culture medium of CER cells infected with MVA; 5 – positive controls of purified recombinant GP protein (to the left) and VP40 MARV (to the right). **C** – electron microscopy analysis of VLP in the culture medium of CER cells infected with the recombinant strain MVA-GP-VP40-MARV

ются частично гликозилированные и расщепленные формы GP. Поскольку матриксный белок VP40 не содержит сайтов гликозилирования, он выявляется в виде белка с молекулярной массой 40 кДа как в культуральной среде инфицированных рекомбинантным вирусом клеток, так и в лизатах данных клеток.

Из данных Вестерн-блот-анализа можно сделать вывод, что происходит секреция ВПЧ вируса Марбург, поскольку оба белка GP и VP40 MARV регистрируются в культуральной среде клеток. Электронно-микроскопический анализ образцов среды клеток, инфицированных рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-MARV, подтверждает эту гипотезу: выявлено большое количество ВПЧ с характерной формой вирионов MARV размером 35–40 нм × 700–900 нм (рис. 1, С).

Оценку иммуногенности и протективности штамма MVA-GP-VP40-MARV проводили на морских свинках, которые чувствительны к летальной инфекции вирусом Марбург. На рис. 2, А представлена выживаемость животных в иммунизированной (опытной) и контрольной группах после инфекции вирусом Марбург в дозе 50 ЛД₅₀. Инфицированных животных наблюдали в течение 24 дней (инкубационный период для лихорадки Марбург). Все животные контрольной группы погибли на 8–14-й день после инфекции, в то время как все животные опытной группы выжили без каких-либо признаков заболевания.

Как следует из рис. 2, В, ИФА образцов сывороток, полученных через четыре недели после двукратной иммунизации морских свинок рекомбинантным вариантом MVA-GP-VP40-MARV, показал наличие антител к вирусу Марбург в титрах от 1:1600 до 1:6400, а антител к вирусу осповакцины – от 1:12800 до 1:102400. Известно, что вирус осповак-

цины формирует перекрестный иммунный ответ на разные ортопоксвирусы, включая высокопатогенные для человека вирус натуральной оспы и вирус оспы обезьян [11]. Таким образом, иммунизация штаммом MVA-GP-VP40-MARV обеспечивает защиту и против этих инфекций.

С целью оценки Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного рекомбинантом MVA-GP-VP40-MARV, проведен анализ структуры генов GP и VP40 MARV с использованием оригинального программного обеспечения TEpredict [10] и предсказана структура пептидов, содержащих Т-хелперные эпитопы этих белков (таблица). Несмотря на то, что программа TEpredict не предназначена для предсказания эпитопов, рестриктированных молекулами МНСII класса морской свинки, мы провели предсказание нонамерных пептидов, способных связываться с наиболее широким спектром алломорф молекул МНСII класса (promiscuous binders), и выбрали фрагменты длиной 16–25 аминокислотных остатков, содержащие несколько таких эпитопов.

Пептиды разделили на две группы, соответствующие белкам VP40 (пептиды 1–4) и GP (пептиды 5–9), и использовали в виде соответствующих смесей для стимуляции спленоцитов вакцинированных морских свинок. Результаты эксперимента представлены на рис. 3.

Как следует из рис. 3, статистически значимое увеличение количества ИФНγ-продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов по сравнению с контролем ($p < 0,01$) зарегистрировано только при стимуляции спленоцитов смесью пептидов белка GP MARV (пептиды 5–9). Полученные данные свидетельствуют о способности рекомбинантной вакцины MVA-GP-VP40-MARV индуцировать не только гуморальное, но и клеточное звено иммунитета против

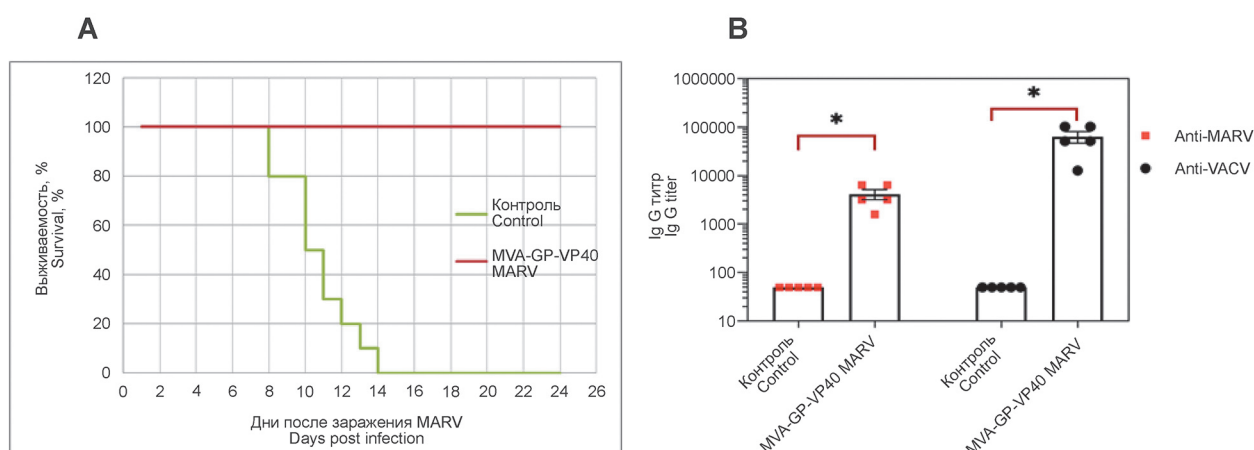


Рис. 2. Оценка протективности (А) и иммуногенности (В) рекомбинантного вируса MVA-GP-VP40-MARV на модели морских свинок:

В – статистическую значимость оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бонферрони; * – различия достоверны при $p < 0,05$. Порог детекции антител – разведение сыворотки 1:40

Fig. 2. Evaluation of the protectivity (А) and immunogenicity (В) of the recombinant virus MVA-GP-VP40-MARV using guinea pig model:

В – P values were determined by 1-way ANOVA followed by Bonferroni post-test; * – differences are significant at $p < 0.05$. The antibody detection limit is serum dilution 1:40

Предсказанные CD4⁺ Т-хелперные эпитопы белков GP и VP40 вируса Марбург
Predicted CD4⁺ T-helper epitopes of the GP and VP40 proteins of Marburg virus

№ пептида Peptide No.	Белок Protein	Пептид Peptide	Фрагмент Fragment	Количество эпитопов Number of epitopes	Количество алломорф Number of allomorph
1	VP40	NYNTYMQYLNPPPYADHGA	6–24	3	17
2	VP40	GVPAWLPLGIMSNFEYPLAH	79–98	4	17
3	VP40	EKTSLFRISLPADMFSVKE	242–260	2	45
4	VP40	PLNGFNNRQVVLAYANPTLS	282–301	5	24
5	GP	LHLWGAFFLYDRIASTTMYRG	137–157	5	29
6	GP	IVNKTVHKMIFSRQGGYRH	169–188	3	31
7	GP	TQHLVYFRKKRSILWREGDM	425–444	4	36
8	GP	ARLRRLANQTAKSLEL	557–572	2	28
9	GP	LLLRVTTEERTFSLINRHAI	571–590	3	11

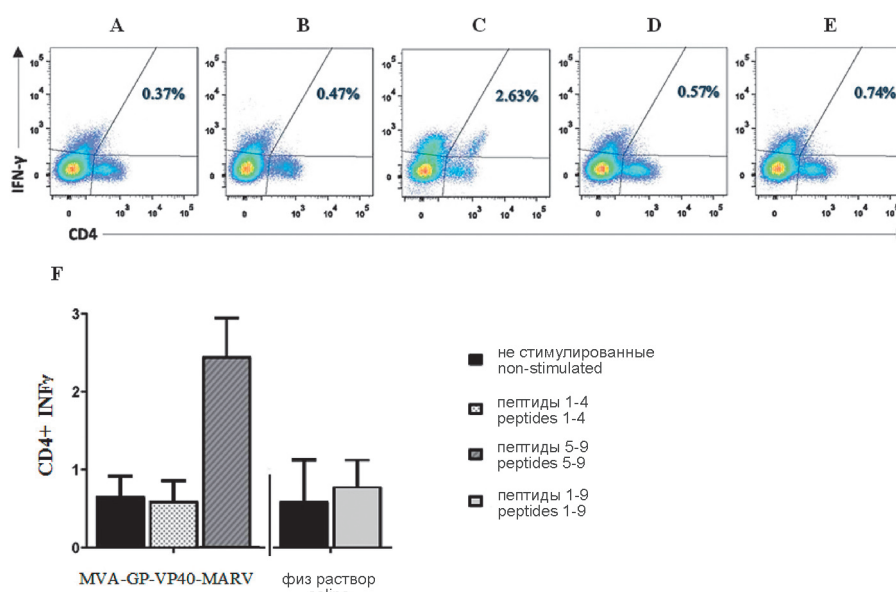


Рис. 3. Результаты анализа вирус-специфического Т-клеточного ответа морских свинок, иммунизированных рекомбинантом MVA-GP-VP40-MARV (n=5) с использованием метода внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS):

A–E – представлены типичные плоты (диаграммы) CD4⁺ Т-лимфоцитов животных, иммунизированных MVA-GP-VP40-MARV (*A, B, C*) или физ. раствором (*D, E*), полученные с помощью проточного цитофлуориметра. На каждом плоте процентное содержание IFN-γ указано в правом верхнем углу; *A, D* – нестимулированные CD4⁺ лимфоциты; *B* – CD4⁺ лимфоциты, стимулированные пулом пептидов 1–4; *C* – CD4⁺ лимфоциты, стимулированные пулом пептидов 5–9; *E* – CD4⁺ лимфоциты, стимулированные пулом пептидов 1–9; *F* – графическое изображение полученных результатов. По оси Y отложен процент CD4⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN-γ. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0. Данные представлены как среднее значение ± среднее квадратичное отклонение

Fig. 3. Results of virus-specific T-cell response in guinea pigs immunized with the recombinant MVA-GP-VP40-MARV (n=5) using the method of intracellular cytokine staining (ICS):

A–E – representative rafts (diagrams) of CD4⁺ T-lymphocytes from animals immunized with MVA-GP-VP40-MARV (*A, B, C*) or saline (*D, E*), obtained with the help of flow cytometer. On each raft, the percentage of IFN-γ is indicated in the upper right corner; *A, D* – un-stimulated CD4⁺ lymphocytes; *B* – CD4⁺ lymphocytes stimulated by a pool of peptides 1–4; *C* – CD4⁺ lymphocytes stimulated by a pool of peptides 5–9; *E* – CD4⁺ lymphocytes stimulated by a pool of peptides 1–9; *F* – graphical image of the results obtained. The y-axis is the percentage of CD4⁺ T-lymphocytes producing IFN-γ. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0 software. Data are presented as mean ± standard deviation

инфекции MARV. Кроме того, нам удалось экспериментально подтвердить биологическую активность Т-хелперных эпитопов белка GP MARV, которые входят в состав группы пептидов 5–9, предсказанных с помощью программы TEPredict.

Сконструированный нами рекомбинантный штамм MVA-GP-VP40-MARV является перспективным вакцинным штаммом, обеспечивающим 100 % защиту от летальной дозы MARV. Штамм MVA-GP-VP40-MARV кроме индукции гуморального и кле-

точного иммунного ответа на вирус Марбург формирует иммунитет и против ортопоксвирусов, включая вирус оспы обезьян [11]. Эта инфекция также чрезвычайно важна для эндемичных в отношении филовирuсов районов Африканского континента. Вспышки оспы обезьян регулярно регистрируются в Африке, в частности в октябре 2016 г. Всемирная организация здравоохранения зарегистрировала более 20 случаев оспы обезьян в Центральноафриканской Республике. Созданный рекомбинантный вариант

VACV может рассматриваться как бивалентная вакцина против вирусов Марбург и оспы обезьян, что представляется целесообразным в связи с высоким пересечением ареалов распространения этих вирусов и опасностью двойного инфицирования.

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

Список литературы

1. Lázaro-Frías A., Gómez-Medina S., Sánchez-Sampedro L., Ljungberg K., Ustav M., Liljeström P., Muñoz-Fontela C., Esteban M., García-Arriaza J. Distinct immunogenicity and efficacy of poxvirus-based vaccine candidates against Ebola virus expressing GP and VP40 proteins. *J. Virol.* 2018; 92(11):e00363-18. DOI: 10.1128/JVI.00363-18.
2. Malherbe D.C., Domi A., Hauser M.J., Meyer M., Gunn B.M., Alter G., Bukreyev A., Guirakhoo F. Modified vaccinia Ankara vaccine expressing Marburg virus-like particles protects guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *NPJ Vaccines.* 2020; 5:78. DOI: 10.1038/s41541-020-00226-y.
3. Volz A., Sutter G. Modified vaccinia virus Ankara: history, value in basic research, and current perspectives for vaccine development. *Adv. Virus Res.* 2017; 97:187–243. DOI: 10.1016/b.s.aivir.2016.07.001.
4. Kolesnikova L., Bohil A.B., Cheney R.E., Becker S. Budding of Marburgvirus is associated with filopodia. *Cell Microbiol.* 2007; 9(4):939–51. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00842.x.
5. Dye J.M., Warfield K.L., Wells J.B., Unfer R.C., Shulenin S., Vu H., Nichols D.K., Aman M.J., Bavari S. Virus-like particle vaccination protects nonhuman primates from lethal aerosol exposure with Marburgvirus (VLP vaccination protects macaques against aerosol challenges). *Viruses.* 2016; 8(4):94. DOI: 10.3390/v8040094.
6. Ткачева А.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Шевелев О.Б., Разумов И.А., Завьялов Е.Л., Локтев В.Б., Кочнева Г.В. Таргетная терапия глиобластомы человека с использованием онколитического потенциала парвовируса и аттенуированных штаммов вируса осповакцины. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2019; 37(2):83–91. DOI: 10.17116/molgen20193702183.
7. Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Sivolobova G.F., Tkacheva A.V., Shvalov A.N., Unusova A.Yu., Ryabchikova E.I., Netesov S.V. Model of artificial metastasis of human epidermoid carcinoma A431 in nude mice for the examination of oncolytic activity of the vaccinia virus. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016; 6(4):469–76. DOI: 10.1134/S2079059716040109.
8. Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Таранов О.С., Якубич С.Н., Филатов П.В. Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*). *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(6):291–7. DOI: 10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297.
9. Srivastava R., Roy S., Coulon P.-G., Vahed H., Prakash S., Dhanushkodi N., Kim G.J., Fouladi M.A., Campo J., Teng A.A., Liang X., Schaefer H., BenMohamed L. Therapeutic mucosal vaccination of herpes simplex virus 2-infected guinea pigs with ribonucleotide reductase 2 (RR2) protein boosts antiviral neutralizing antibodies and local tissue-resident CD4+ and CD8+ TRM cells associated with protection against recurrent genital herpes. *J. Virol.* 2019; 93(9):e02309-18. DOI: 10.1128/JVI.02309-18.
10. Reguzova A., Antonets D., Karpenko L., Ilyichev A., Maksyutov R., Bazhan S. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens. *PLoS One.* 2015; 10(3):e0116412. DOI: 10.1371/journal.pone.0116412.
11. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N., Blum D.L., Hughes L.J., Satheshkumar P.S., Townsend M.B., Kondas A.V., Reed Z., Weiner Z., Olson V.A., Hammarlund E., Raue H.-P., Slifka M.K., Slaughter J.C., Graham B.S., Edwards K.M., Eisenberg R.J., Cohen G.H., Joyce S., Crowe J.R. Jr. Cross-neutralizing and protective human antibody specificities to poxvirus infections. *Cell.* 2016; 167(3):684–694.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.049.

References

1. Lázaro-Frías A., Gómez-Medina S., Sánchez-Sampedro L., Ljungberg K., Ustav M., Liljeström P., Muñoz-Fontela C., Esteban M., García-Arriaza J. Distinct immunogenicity and efficacy of poxvirus-based vaccine candidates against Ebola virus expressing GP and VP40 proteins. *J. Virol.* 2018; 92(11):e00363-18. DOI: 10.1128/JVI.00363-18.
2. Malherbe D.C., Domi A., Hauser M.J., Meyer M., Gunn B.M., Alter G., Bukreyev A., Guirakhoo F. Modified vaccinia Ankara

vaccine expressing Marburg virus-like particles protects guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *NPJ Vaccines.* 2020; 5:78. DOI: 10.1038/s41541-020-00226-y.

3. Volz A., Sutter G. Modified vaccinia virus Ankara: history, value in basic research, and current perspectives for vaccine development. *Adv. Virus Res.* 2017; 97:187–243. DOI: 10.1016/b.s.aivir.2016.07.001.

4. Kolesnikova L., Bohil A.B., Cheney R.E., Becker S. Budding of Marburgvirus is associated with filopodia. *Cell Microbiol.* 2007; 9(4):939–51. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00842.x.

5. Dye J.M., Warfield K.L., Wells J.B., Unfer R.C., Shulenin S., Vu H., Nichols D.K., Aman M.J., Bavari S. Virus-like particle vaccination protects nonhuman primates from lethal aerosol exposure with Marburgvirus (VLP vaccination protects macaques against aerosol challenges). *Viruses.* 2016; 8(4):94. DOI: 10.3390/v8040094.

6. Tkacheva A.V., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., Shevelev O.B., Razumov I.A., Zav'yalov E.L., Loktev V.B., Kochneva G.V. [Targeted therapy of human glioblastoma combining the oncolytic properties of parvovirus H-1 and attenuated strains of the vaccinia virus]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2019; 37(2):83–91. DOI: 10.17116/molgen20193702183.

7. Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Sivolobova G.F., Tkacheva A.V., Shvalov A.N., Unusova A.Yu., Ryabchikova E.I., Netesov S.V. Model of artificial metastasis of human epidermoid carcinoma A431 in nude mice for the examination of oncolytic activity of the vaccinia virus. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016; 6(4):469–76. DOI: 10.1134/S2079059716040109.

8. Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Taranov O.S., Yakubitsky 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.

9. Srivastava R., Roy S., Coulon P.-G., Vahed H., Prakash S., Dhanushkodi N., Kim G.J., Fouladi M.A., Campo J., Teng A.A., Liang X., Schaefer H., BenMohamed L. Therapeutic mucosal vaccination of herpes simplex virus 2-infected guinea pigs with ribonucleotide reductase 2 (RR2) protein boosts antiviral neutralizing antibodies and local tissue-resident CD4+ and CD8+ TRM cells associated with protection against recurrent genital herpes. *J. Virol.* 2019; 93(9):e02309-18. DOI: 10.1128/JVI.02309-18.

10. Reguzova A., Antonets D., Karpenko L., Ilyichev A., Maksyutov R., Bazhan S. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens. *PLoS One.* 2015; 10(3):e0116412. DOI: 10.1371/journal.pone.0116412.

11. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N., Blum D.L., Hughes L.J., Satheshkumar P.S., Townsend M.B., Kondas A.V., Reed Z., Weiner Z., Olson V.A., Hammarlund E., Raue H.-P., Slifka M.K., Slaughter J.C., Graham B.S., Edwards K.M., Eisenberg R.J., Cohen G.H., Joyce S., Crowe J.R. Jr. Cross-neutralizing and protective human antibody specificities to poxvirus infections. *Cell.* 2016; 167(3):684–694.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.049.

Authors:

Semenova A.V., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., P'yankov S.A., Taranov O.S., P'yankov O.V., Antonets D.V., Karpenko L.I., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Kochneva G.V. State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Shul'gina I.S. State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation; e-mail: vector@vector.nsc.ru. Novosibirsk State Agrarian University; 160, Dobrolyubova St., Novosibirsk, 630039, Russian Federation; e-mail: rector@nsau.edu.ru.

Chikaev A.N. Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. 8/2, Academician Lavrent'ev Avenue, Novosibirsk, 630090, Russian Federation. E-mail: info@mcb.nsc.ru.

Об авторах:

Семенова А.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Пьянков С.А., Таранов О.С., Пьянков О.В., Антонет Д.В., Карпенко Л.И., Старостина Е.В., Боргоякова М.Б., Гаврилова Е.В., Максютков Р.А., Кочнева Г.В. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Шульгина И.С. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»; Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово. Новосибирский государственный аграрный университет; Российская Федерация, 630039, Новосибирск, ул. Добролюбова, 160; e-mail: rector@nsau.edu.ru.

Чикаев А.Н. Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН. Российская Федерация, 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8/2. E-mail: info@mcb.nsc.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-150-156

УДК 616.98:578.8(470.44)

Л.Н. Яшина¹, Т.В. Трегубчак¹, Б.С. Малышев¹, Н.А. Сметанникова¹, И.В. Грищенко¹, А.А. Дольский¹,
А.Н. Швалов¹, А.В. Зайковская¹, А.В. Казанцев², В.Н. Чекашов², Т.Ю. Красовская²

ВОЗБУДИТЕЛЬ ВСПЫШКИ ГЛПС В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ, 2019 г.

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Российская Федерация;

²ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Патогенные хантавирусы, принадлежащие к роду *Orthohantavirus* семейства *Hantaviridae*, широко распространены во многих регионах мира и являются возбудителями геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) в Европе и Азии. На территории европейской части России наиболее активные очаги ГЛПС располагаются на территории оптимума ареала обитания природного носителя вируса Пуумала (PUUV), рыжих полевков (*Myodes glareolus*), – в Среднем Поволжье и Предуралье. Наибольшее количество заболевших ГЛПС регистрируется в Приволжском федеральном округе. В 2019 г. на территории Саратовской области зарегистрирована вспышка ГЛПС, число заболевших составило 2702 человека, среди которых преобладали жители Саратова и Саратовского района. **Цель работы** – генетическое типирование возбудителей от больных ГЛПС и носителей во время вспышки 2019 г. в Саратове и филогенетический анализ полноразмерных геномов вируса от природных носителей. **Материалы и методы.** Для генетического исследования использовано восемь образцов от больных ГЛПС из Саратова (2019) и три образца тканей легких рыжих полевков, отловленных в окрестностях Саратова (2019). Все образцы проанализированы методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием и филогенетическим анализом. **Результаты и обсуждение.** Генотипированы шесть РНК-изолатов хантавирусов от больных ГЛПС, получены полноразмерные геномы трех РНК-изолатов от носителей вируса. Показано, что возбудителем вспышки ГЛПС в Саратове был вирус PUUV. Исследованный вариант вируса относится к генетической ветви RUS, наиболее близок к штаммам из Удмуртии и Татарстана и отличается от вариантов вируса, циркулирующих на территории Республики Башкортостан и Самарской области.

Ключевые слова: хантавирус, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, вспышка ГЛПС, Россия.

Корреспондирующий автор: Яшина Людмила Николаевна, e-mail: vector@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Яшина Л.Н., Трегубчак Т.В., Малышев Б.С., Сметанникова Н.А., Грищенко И.В., Дольский А.А., Швалов А.Н., Зайковская А.В., Казанцев А.В., Чекашов В.Н., Красовская Т.Ю. Возбудитель вспышки ГЛПС в Саратовской области, 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:150–156. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-150-156

Поступила 07.06.2021. Принята к публ. 13.06.2021.

L.N. Yashina¹, T.V. Tregubchak¹, B.S. Malyshev¹, N.A. Smetannikova¹, I.V. Grishchenko¹,
A.A. Dol'sky¹, A.N. Shvalov¹, A.V. Zaykovskaya¹, A.V. Kazantsev², V.N. Chekashov²,
T.Yu. Krasovskaya²

Hantavirus Associated with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Outbreak in the Saratov Region in 2019

¹State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

²Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. Pathogenic hantaviruses, belonging to the family *Hantaviridae*, genus *Orthohantavirus*, are widely spread in many regions of the world and cause hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Europe and Asia. In the European Russia, the most active HFRS foci are located in the optimum habitat area of natural reservoir of the Puumala virus (PUUV), bank voles (*Myodes glareolus*), – in the Middle Volga and Cis-Urals. The largest number of cases of HFRS was registered in the Volga Federal District. In 2019, an outbreak of HFRS was registered among the residents of Saratov and the Saratov Region, the number of cases was 2702. **Objective** of the study was genetic identification of hantaviruses from HFRS patients and rodent carriers and phylogenetic analysis of full-size genomes from natural hosts during HFRS outbreak in the Saratov Region, 2019. **Materials and methods.** Blood samples of 8 HFRS patients from Saratov and 3 lung samples of bank voles captured in the suburb of Saratov were analyzed using reverse transcription polymerase chain reaction, followed by sequencing and phylogenetic analysis. **Results and discussion.** A total of 6 viral RNA isolates from HFRS patients were genetically typed, full-length RNA-isolate genomes were obtained for 3 natural carriers. Our data indicate that PUUV virus was associated with HFRS outbreak in Saratov. Genetic analysis revealed that the virus belonged to RUS lineage of PUUV, related most closely to strains from Udmurtia and Tatarstan and differed from strains circulating in the territory of Bashkortostan and Samara Region.

Key words: hantavirus, hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS outbreak, Russia.

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

Corresponding author: Lyudmila N. Yashina, e-mail: vector@vector.nsc.ru.

Citation: Yashina L.N., Tregubchak T.V., Malyshev B.S., Smetannikova N.A., Grishchenko I.V., Dol'sky A.A., Shvalov A.N., Zaykovskaya A.V., Kazantsev A.V., Chekashov V.N., Krasovskaya T.Yu. Hantavirus Associated with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Outbreak in the Saratov Region in 2019. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:150–156. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-150-156

Received 07.06.2021. Accepted 13.06.2021.

Yashina L.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2844-7835>
Tregubchak T.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9608-2044>
Malyshev B.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3004-3020>
Smetannikova N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5082-8071>
Grishchenko I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2227-8500>
Dol'sky A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9956-1163>

Shvalov A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6890-1575>
Zaykovskaya A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>
Kazantsev A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1790-0411>
Chekashov V.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9593-4353>
Krasovskaya T.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7663-5502>

В настоящее время геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) выявлена на всех континентах [1–2]. Заболевание вызывают вирусы, принадлежащие к роду *Orthohantavirus*, включая вирус Хантаан (HTNV) и его генетический вариант Амур (AMRV), Сеул (SEOV), Добrava/Белград (DOBV), Пуумала (PUUV) и Тула (TULV). Хантавирусы (семейство *Hantaviridae*) имеют РНК-геном отрицательной полярности, состоящий из трех сегментов: малого (S), среднего (M) и большого (L).

До недавнего времени ГЛПС занимала лидирующее положение по заболеваемости среди природно-очаговых заболеваний человека в Российской Федерации. По данным Роспотребнадзора, только с 2000 по 2018 год в 68 субъектах Российской Федерации зарегистрировано 137430 случаев заболевания ГЛПС, из них 570 – с летальным исходом. Пространственное распределение природных очагов и характер циркуляции возбудителя обусловлен распространением и экологическими особенностями их резервуарных хозяев. На европейской части территории ГЛПС вызывает в основном вирус PUUV, который циркулирует в лесных очагах инфекции [3]. Широкое распространение хантавируса PUUV связано с обширным ареалом рыжей полевки (*Myodes glareolus*), которая служит его основным резервуаром в природе и источником заражения людей. Поэтому наиболее активные лесные очаги ГЛПС расположены в оптимальном ареале этих грызунов – в Среднем Поволжье и Предуралье [4]. Наибольшее количество заболевших ГЛПС регистрируется в Приволжском федеральном округе. По данным Роспотребнадзора, именно на этот регион приходится 82,2 % от общей заболеваемости по стране. Часть (0,8 %) случаев ГЛПС связана с инфицированием двумя вариантами вируса DOBV, Куркино (DOBV-Aa) и Сочи (DOBV-Ар), ассоциированными с западным подвидом полевой мыши (*Apodemus agrarius agrarius*) и кавказской лесной мыши (*Apodemus ponticus*) соответственно [3]. В последние годы в Европе выявлены случаи инфицирования людей вирусом TULV [5], однако в РФ прецедентов не было, хотя циркуляция вируса установлена в нескольких видах природных носителей [6–8].

PUUV вместе со своим хозяином, рыжей полевкой, найден по всей территории Европы, за исключением района Средиземноморского побережья, Испании и Греции [9]. Штаммы PUUV группируются по географическому признаку, отражающему историю и пути распространения природного хозяина вируса – рыжей полевки [10]. Последние изменения в распространении рыжей полевки произошли 10 тыс. лет назад после ледникового периода, когда грызу-

ны повторно колонизировали Европу и особенно Скандинавский полуостров. Показано, что миграция шла по трем направлениям и проявилась в эволюционных взаимосвязях PUUV. Филогенетическое дерево включает восемь ветвей PUUV: финскую (FIN), российскую (RUS), северо-скандинавскую (N-SCA), южно-скандинавскую (S-SCA), датскую (DAN), латвийскую (LAT), альпо-адриатическую (ALAD) и центрально-европейскую (CE) [9]. Поскольку штаммы, входящие в каждую из ветвей, достаточно разнородны (14,0–16,6 % различий), они разбиваются на группы.

Однако к востоку от Урала рыжая полевка не так многочисленна и, как правило, уступает по численности красной и красно-серой полевкам. На территории азиатской части континента циркулируют PUUV-подобные вирусы. Первым из PUUV-подобных хантавирусов открыт вирус Хоккайдо (HOKV) [11]. Установлено, что HOKV широко распространен на территории азиатской части России и циркулирует в двух видах полевых: красно-серой (*Myodes rufocanus*) и красной (*Myodes rutilus*) [12]. В Корею от королевских полевых *Myodes regulus* (прежнее название *Eothenomys regulus*) выявлены РНК-изоляты PUUV-подобного хантавируса, названного вирусом Muji (MUJV) [13]. В Китае от полевых *Myodes eleus* выявлен еще один PUUV-подобный вирус – Fusong (FUSV) [14]. Таким образом, в настоящее время филогенетическая клада PUUV-подобных вирусов образована тремя видами хантавирусов, ассоциированными с полевками рода *Myodes*: HOKV, MUJV и FUSV.

Российские штаммы PUUV входят в состав двух ветвей, RUS и FIN, каждая из которых делится на группы. Штаммы с территории европейской части России образуют пять групп: «Самара», «Татарстан-Удмуртия», две группы штаммов из Башкортостана, входящие в состав ветви RUS, и штаммы из Карелии, входящие в группу «Карелия-Финляндия» ветви FIN [9, 15, 16]. На территории Омской и Тюменской областей среди *M. glareolus* установлена циркуляция группы «Омск-Тюмень», также входящей в состав ветви FIN, объединяющей штаммы из Финляндии и России [12, 17].

Динамика заболеваемости ГЛПС характеризуется циклическими подъемами, которые регистрируются каждые 2–4 года с двухлетними пиками, как в 2008–2009 и 2014–2015 гг. Определяющим фактором является инфицированность и численность рыжей полевки, зависящая от климатических условий, кормовой базы и доступных мест обитания. В 2019 г. на территории России зарегистрировано 13996 случаев ГЛПС, что связано с увеличением числа случаев ГЛПС в 2,5 раза во всех субъектах Приволжского фе-

дерального округа [4]. Наиболее выраженный рост количества больных ГЛПС в 2019 г. отмечен на территории Саратовской области, где зарегистрировано 2702 случая, в том числе среди жителей Саратова и Саратовского района число заболевших составило 2084 человека [18]. Заражение этих лиц в подавляющем большинстве случаев связано с пребыванием в природном парке «Кумысная поляна» или его окрестностях. Показано, что основными факторами, повлиявшими на резкий рост заболеваемости ГЛПС, послужили высокая численность инфицированных грызунов, обусловленная относительно мягкой и снежной зимой 2018–2019 гг., и неудовлетворительное лесопарковое состояние зон отдыха в окрестностях города Саратова.

Цель исследований – генетический анализ вирусов-возбудителей от больных ГЛПС и носителей во время вспышки 2019 г. в Саратове и полноразмерных геномов вирусов от природных носителей.

Материалы и методы

Клинический диагноз ГЛПС у больных из вспышки в Саратове подтвержден наличием специфических антител классов IgG и IgM методом ИФА с помощью тест-систем «ВектоХанта-IgG» и «ВектоХанта-IgM» («Вектор-Бест», Россия) и выявлением вирусной РНК в образцах крови методом ОТ-ПЦР с помощью тест-системы «ОМ-Скрин-ГЛПС-РВ» («Синтол», Россия). Той же тест-системой присутствие вирусной РНК выявляли в образцах легких рыжих полевок. РНК выделяли из сгустков крови больных ГЛПС и суспензий легких грызунов с помощью набора «Рибо-преп» (ЦНИИ эпидемиологии, Россия).

Генетическое типирование хантавирусов в РНК-содержащих образцах проводили с использованием серии праймеров, описанной ранее [19]. Вирусную кДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы RevertAid Premium (Thermo Scientific, США) и родоспецифического праймера HPS (5'-TAGTAGTAGACTCC). Продукты двухраундовой амплификации получали по стандартному протоколу с использованием Hot start Taq ДНК-полимеразы производства «Сибэнзим» (Россия). Серию праймеров для получения полноразмерных последовательностей генома выбирали авторы.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма MUSCLE в программе MEGA7. Для построения филогенетических деревьев использован метод ближайших соседей (Neighbour-joining) с моделью эволюции Tamura-Nei [20]. Вычисления проводили для 1000 итераций.

Полученные нуклеотидные последовательности фрагмента L-сегмента генома депонированы в банке данных GenBank под номерами MN627217–MN627220, MZ014463–MZ014464, полноразмерные геномы – MZ014465–MZ014473.

Результаты и обсуждение

Исследован материал (кровь, сыворотка крови) от пациентов с клиническим (предварительным) диагнозом ГЛПС, находившихся на лечении в медицинских организациях Саратова. Носителей (рыжих полевок) отлавливали в природном парке «Кумысная поляна» и его окрестностях. Первичный скрининг образцов крови пациентов и образцов суспензий легких рыжих полевок с помощью тест-системы «ОМ-Скрин-ГЛПС-РВ» выявил значения порогового цикла Ct в образцах от пациентов в интервале 23,9–29,6, а в образцах тканей легких рыжих полевок – в интервале 13,4–33,8. Установлен высокий уровень инфицированности рыжих полевок, в 14 из 21 (66,7 %) обследованных животных обнаружена РНК вируса Пуумала.

Для дальнейшего анализа отобрано восемь образцов крови от больных ГЛПС со среднетяжелым клиническим течением из Саратова, в крови которых обнаружена РНК вируса Пуумала со значением Ct не менее 30,0. В сыворотке крови этих пациентов выявлены антитела классов IgM и IgG к хантавирусам – возбудителям ГЛПС. Для анализа носителей вируса отобраны три образца тканей легких от рыжих полевок со значениями Ct в интервале 13,4–16,4.

Для типирования возбудителя ГЛПС использованы препараты крови больных ГЛПС, заболевших в мае 2019 г., и образцы природных носителей, отловленных в окрестностях Саратова в тот же период и имеющих вирусную РНК. Анализ проводили методом двухраундовой ОТ-ПЦР с использованием родоспецифических праймеров к L-сегменту генома [19]. Положительными оказались шесть из восьми исследованных образцов от больных ГЛПС и три из трех от рыжих полевок. Сравнение полученных последовательностей фрагментов L-сегмента генома с опубликованными в банке данных GenBank показало, что новые РНК-изоляты принадлежат к хантавирусу PUUV (рис. 1). РНК-изоляты из Саратова отличались друг от друга не более чем на 0,7 % и были наиболее близки к генетическому варианту PUUV, ранее выявленному в образцах от рыжих полевок из Самарской области и Республики Татарстан (штаммы Samara_94/CG/2005, Samara_49/CG/2005, Kazan). Различие новых нуклеотидных последовательностей с указанными штаммами составляло 3,6–4,6 %. Большой процент различия (11,6–12,2 %) выявлен со штаммами из Башкортостана (CG1820/POR, DTK/Ufa-97), также входящими в генетическую ветвь RUS, и со штаммами, относящимися к другим генетическим ветвям (более 12,2 %).

Для анализа полноразмерных геномов выбраны три образца суспензий легких от носителей вируса, рыжих полевок (*M. glareolus*), отловленных на территории природного парка «Кумысная поляна» в окрестностях Саратова. РНК, выделенная из тканей легких, использована для получения полноразмерных малого (S), среднего (M) и большого (L) сегментов

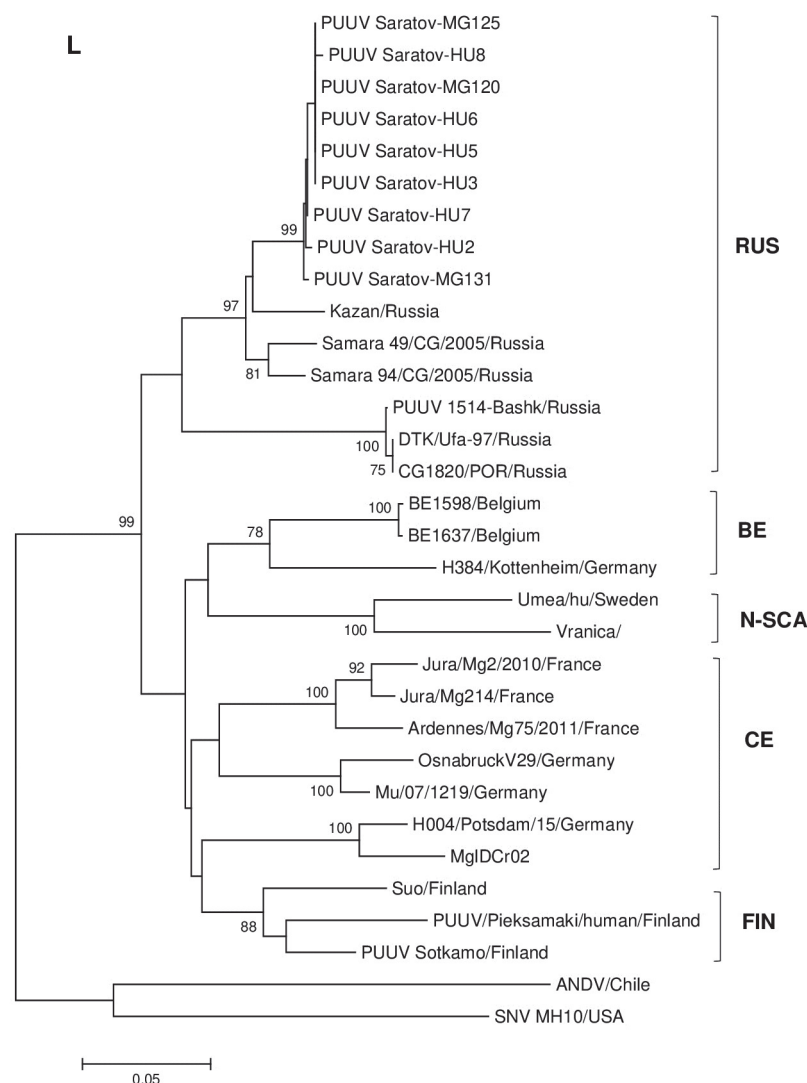


Рис. 1. Филогенетическое дерево, отображающее взаимосвязи хантавирусов от больных и носителей вируса из вспышки ГЛПС Саратов-2019 и штаммов PUUV из других регионов. Дерево построено на основе нуклеотидных последовательностей L-сегмента генома (позиции 2969–3314) с использованием метода NJ, индексы поддержки рассчитаны для 1000 повторов. Жирным шрифтом выделены исследованные РНК-изоляты хантавирусов

Fig. 1. Phylogenetic tree demonstrating the relations of hantaviruses from patients and carriers of the virus from the HFRS outbreak in Saratov in 2019 and PUUV strains from other regions. The tree was built on the basis of the nucleotide sequences of the L-segment of the genome (positions 2969–3314) using the NJ approach, the support indices were calculated for 1000 repeats. The investigated hantavirus RNA isolates are shown in bold

генома. Праймеры для получения и секвенирования полноразмерных сегментов генома изолятов вируса выбраны на основе опубликованных ранее полноразмерных геномов штаммов из Самары. В базе данных GenBank наиболее полно представлены S-сегменты генома, принадлежащие ко всем известным ветвям вируса PUUV, для меньшего числа штаммов определены последовательности M-сегмента и лишь для ограниченного числа штаммов опубликованы последовательности полноразмерных L-сегментов генома. Поэтому анализ именно S-сегмента позволяет наиболее четко определить таксономическое положение исследованного варианта вируса.

Длина S-сегмента составила 1821 нуклеотид. Кодированная область нуклеокапсидного белка (N) располагалась в позициях 43–1344. Как и в случае других PUUV, в перекрывающейся рамке +1 (позиции 84–355) обнаружен неструктурный белок (NSs) длиной 90 аминокислотных остатков [21]. Кроме того, в комплементарной цепи выявлена дополнительная рамка считывания (позиции 782–414), кодирующая гипотетический белок NSs(-) длиной 122 аминокислотных остатка. Такой же гипотетический

белок выявлен в нуклеотидных последовательностях других штаммов ветви RUSS (Kazan, CG18-20, CG17). Нуклеотидные последовательности S-сегментов генома трех новых РНК-изолятов от носителей вируса отличались на 0,2–0,3 %, аминокислотные последовательности были идентичными. Филогенетический анализ на основе кодирующей области S-сегмента выявил существование четырех групп российских штаммов среди доступных полноразмерных последовательностей, относящихся к ветви RUSS. Новые изоляты из Саратова объединялись с российскими штаммами группы «Татарстан-Удмуртия» (Kazan и Udmurtia/458/Cg) и образовывали новую подгруппу «Саратов» (рис. 2). Различие кодирующих нуклеотидных (нт) последовательностей двух подгрупп составило 3,2–4,0 % и 0,2–0,5 % для аминокислотных (ак) последовательностей. Различие со штаммами группы «Самара» (Samara_94/CG/2005 и Samara_49/CG/2005) составило 4,9–5,1 % нт и 0,5 % ак, а со штаммами группы «Башкортостан» – более 5,4 % нт и 0,9 % ак. Для второй группы штаммов из Башкортостана доступны лишь короткие последовательности S-сегмента, поэтому они не включены в филогенетический ана-

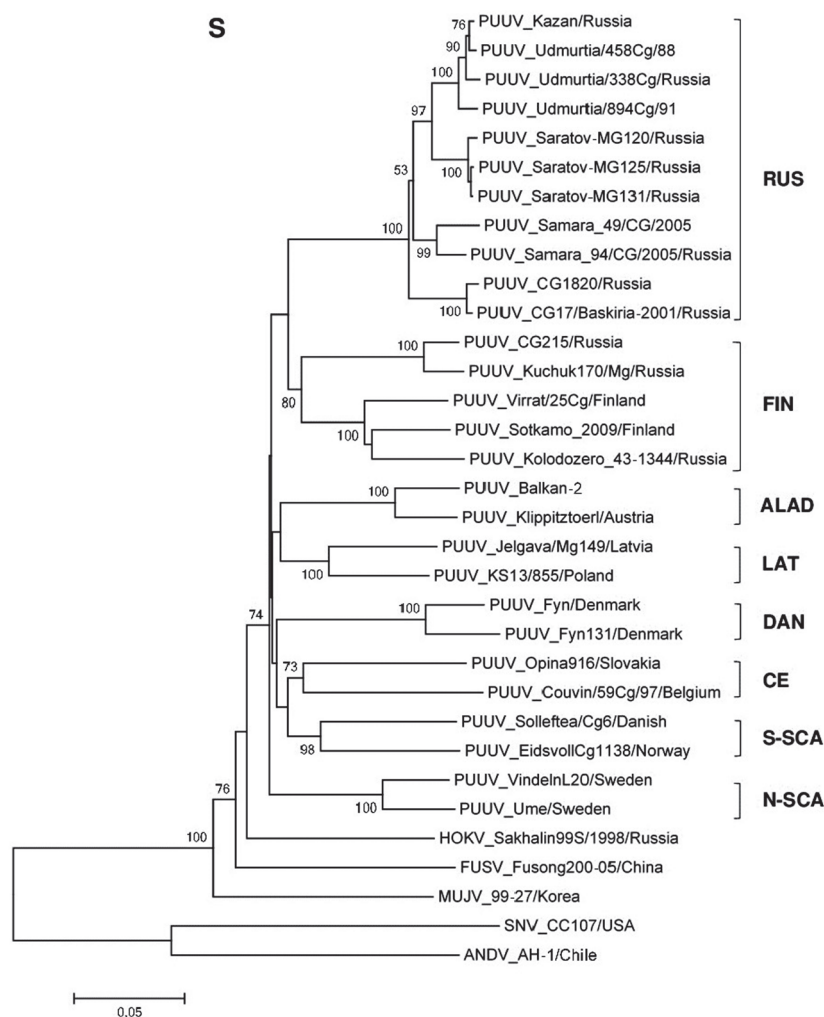
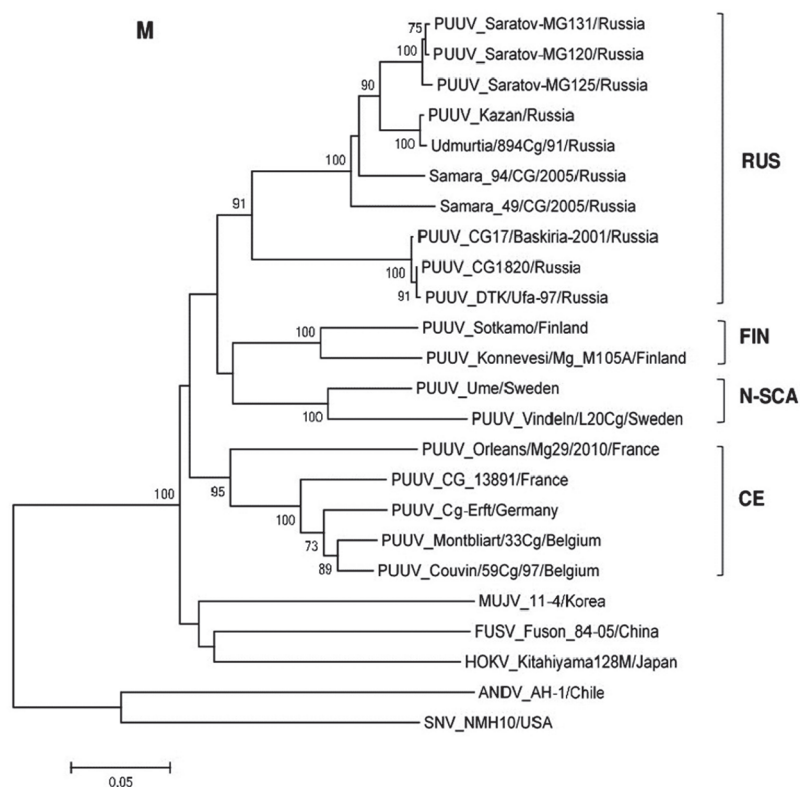


Рис. 2. Филогенетические деревья, отображающие взаимосвязи хантавирусов от носителей вируса из вспышки ГЛПС Саратов-2019, полевков *Myodes glareolus*, и штаммов PUUV из других регионов. Деревья построены на основе кодирующей области (S) S-сегмента генома (позиции 43–1344), (M) M-сегмента (позиции 41–3487) с использованием метода NJ, индексы поддержки рассчитаны для 1000 повторов. Жирным шрифтом выделены исследованные РНК-изоляты хантавирусов

Fig. 2. Phylogenetic trees depicting the relations of hantaviruses from carriers of the virus from the HFRS outbreak in Saratov in 2019, voles *Myodes glareolus*, and PUUV strains from other regions. Trees were built on the basis of the coding region (S) of the S-segment of the genome (positions 43–1344), (M) M-segment (positions 41–3487) using the NJ method, support indices were calculated for 1000 repeats. The investigated hantavirus RNA isolates are shown in bold



лиз, однако различие на этом участке генома составило 11,5–14,3 % нт. Различие со штаммами PUUV из других генетических ветвей, включая российские штаммы ветви FIN из Омска и Карелии, более значительно и достигало 16,8 % нт и 4,2 % ак.

Длина М-сегмента составляла 3682 нуклеотида с кодирующей областью поверхностного гликопротеина, расположенной в позициях 41–3486. Нуклеотидные последовательности М-сегментов трех РНК-изолятов отличались друг от друга на 0,6–0,9 %, аминокислотные последовательности отличались на 0,4–0,6 %. На филогенетическом дереве М-сегмента новые изоляты так же, как и в случае S-сегмента, входили в состав ветви RUS, объединялись с российскими штаммами группы «Татарстан-Удмуртия» (Kazan и Udmurtia/894Cg) и образовывали новую подгруппу «Саратов» (рис. 2), тогда как штаммы из Башкортостана формировали отдельную подгруппу. Различие новых последовательностей гена гликопротеина от наиболее близких штаммов Kazan, Udmurtia/894Cg, Samara 94/CG/2005 и Samara_49/CG/2005 составило 4,1–7,1 % для нуклеотидных и 0,7–1,0 % для аминокислотных последовательностей. Большой процент различий выявлен со штаммами группы «Башкортостан» (>14,4 % нт и >3,6 % ак) и ветви FIN (>15,7 % нт и >4,7 % ак), включающей группу российских штаммов «Омск», так же как и со штаммами из других генетических ветвей, выявленных в европейских странах (>18,5 % нт и >8,4 % ак).

L-сегмент длиной 6550 нуклеотидов кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу в позициях 37–6507. Различие нуклеотидных последовательностей трех РНК-изолятов составляло 0,8–1,0 %, аминокислотных последовательностей – 0–0,2 %. Так же, как в случае S- и М-сегментов, новые изоляты наиболее близки ранее опубликованным изолятам из Казани (Kazan) и Самары (Samara_94/CG/2005 и Samara_49/CG/2005), различие не превышало 4,6–6,7 % нт и 0,5–1,0 % ак, тогда как со штаммами ветви RUS из Башкирии (CG18-20, TKD) составляло 13,2–13,3 % нт и 1,2–1,3 % ак, а со штаммами, входящими в состав других генетических ветвей, – 5,0–18,0 % нт и 2,6–5,8 % ак.

Таким образом, анализ фрагментов генома от больных ГЛПС и полноразмерных геномов от носителей вируса показал, что вспышка ГЛПС в 2019 г. в Саратове вызвана PUUV, циркулирующим в популяции рыжих полевых и генетически близким к ранее описанным вариантам вируса из Республики Татарстан, Удмуртии и Самарской области.

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

Финансирование. Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания ГЗ-7/16.

Список литературы

1. Jonsson C.B., Figueiredo L.T., Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010; 23(2):412–41. DOI: 10.1128/CMR.00062-09.
2. Clement J., LeDuc J.W., Lloyd G., Reynes J.M., McElhinney L., Van Rans M., Lee H.W. Wild rats, laboratory rats, pet rats: global Seoul hantavirus disease revisited. *Viruses*. 2019; 11(7):652. DOI: 10.3390/v11070652.
3. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., Kurashova S.S., Balkina A.S., Tkachenko P.E., Kruger D.H., Klempa B. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12):2325–7. DOI: 10.3201/eid2512.181649.
4. Савицкая Т.А., Иванова А.В., Исаева Г.Ш., Решетникова И.Д., Трифонов В.А., Зиятдинов В.Б., Серова И.В., Сафронов В.А. Оценка эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в мире и России, прогноз на 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:62–70. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-62-70.
5. Reynes J.M., Carli D., Boukezia N., Debruyne M., Herti S. Tula hantavirus infection in a hospitalised patient, France, June 2015. *Euro Surveill.* 2015; 20(50). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.50.30095.
6. Plyusnin A., Vapalahti O., Lankinen H., Lehtvaslainho H., Apekina N., Myasnikov Y., Kallio-Kokko H., Henttonen H., Lundkvist A., Brummer-Korvenkontio M., Gavrilovskaya I., Vaheri A. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. *J. Virol.* 1994; 68(12):7833–9. DOI: 10.1128/JVI.68.12.7833-7839.1994.
7. Якименко В.В., Деконенко А.Е., Малькова М.Г., Кузьмин И.В., Танцев А.К., Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А. О распространении хантавирусов в Западной Сибири. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2000; 3:21–8.
8. Яшина Л.Н., Зайковская А.В., Протопопова Е.В., Бабкин И.В., Малышев Б.С., Товпинец Н.Н., Евстафьев И.Л. Хантавирус Тула на территории Крыма. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2015; 4:38–41.
9. Castel G., Chevenet F., Razzauti M., Murri S., Marianneau P., Cossou J.F., Tordo N., Plyusnin A. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe. *Viruses*. 2019; 11(8):679. DOI: 10.3390/v11080679.
10. Plyusnin A., Morzunov S.P. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001; 256:47–75. DOI: 10.1007/978-3-642-56753-7_4.
11. Kariwa H., Yashimatsu K., Sawabe J., Yokota E., Arikawa J., Takashima I., Fukushima H., Lundkvist A., Shubin F.N., Isachkova L.M., Slonova R.A., Leonova G.N., Hashimoto N. Genetic diversities of hantaviruses among rodents in Hokkaido, Japan and Far East Russia. *Virus Res.* 1999; 59(2):219–28. DOI: 10.1016/S0168-1702(98)00141-5.
12. Yashina L.N., Abramov S.A., Dupal T.A., Danchinova G.A., Malyshev B.S., Hay J., Gu S.H., Yanagihara R. Hokkaido genotype of Puumala virus in the grey red-backed vole (*Myodes rufocanus*) and northern red-backed vole (*Myodes rutilus*) in Siberia. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 33:304–13. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.05.021.
13. Song K.J., Baek L.J., Moon S., Ha S.J., Kim S.H., Park K.S., Klein T.A., Sames W., Kim H.C., Lee J.S., Yanagihara R., Song J.W. Muju virus, a novel hantavirus harboured by the arvicolid rodent *Myodes regulus* in Korea. *J. Gen. Virol.* 2007; 88:3121–9. DOI: 10.1099/vir.0.83139-0.
14. Ge X.Y., Yang W.H., Pan H., Zhou J.H., Han X., Zhu G.J., Desmond J.S., Daszak P., Shi Z.L., Zhang Y.Z. Fugong virus, a novel hantavirus harbored by the small oriental vole (*Eothenomys eleusis*) in China. *Virol. J.* 2016; 13:27–33. DOI: 10.1186/s12985-016-0483-9.
15. Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., Shipulin G.A. Genetic diversity and geographic distribution of hantaviruses in Russia. *Zoon. Pub. Health.* 2009; 56(6-7):297–309. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01210.x.
16. Яшина Л.Н., Кузина И.И., Малышева Т.В., Иванов Л.И., Хасанова С.С. Применение амплификационной тест-системы для диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом и изучения генотипов вирусов-возбудителей. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2004; 8:40–3.
17. Dekonenko A., Yakimenko V., Ivanov A., Morozov V., Nikitin P., Khasanova S., Dzagurova T., Tkachenko E., Schmaljohn C. Genetic similarity of Puumala viruses found in Finland and western Siberia and of the mitochondrial DNA of their rodent hosts suggests a common evolutionary origin. *Infect. Genet. Evol.* 2003; 3:245–57.
18. Иванова А.В., Сафронов В.А., Попов Н.В., Кожанова О.И., Матвеева Н.И., Крессова У.А., Чумачкова Е.А., Поспелов

М.В., Архипова Г.Н., Вяткин И.Н., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Эпидемиологические особенности вспышки ГЛПС в Саратовской области 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:78–85. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-78-85.

19. Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Denys C., Koivogui L., ter Meulen J., Krüger D.H. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5):838–40. DOI: 10.3201/eid1205.051487.

20. 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(10):2731–9. DOI:10.1093/molbev/msr121.

21. Jaaskelainen K.M., Kaukinen P., Minskaya E.S., Plyusnina A., Vapalahti O., Elliott R.M., Weber F., Vaheri A., Plyusnin A. Tula and Puumala hantavirus NSs ORFs are functional and the products inhibit activation of the interferon-beta promoter. *J. Med. Virol.* 2007; 79(10):1527–36. DOI: 10.1002/jmv.20948.

References

1. Jonsson C.B., Figueiredo L.T., Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010; 23(2):412–41. DOI: 10.1128/CMR.00062-09.

2. Clement J., LeDuc J.W., Lloyd G., Reynes J.M., McElhinney L., Van Rans M., Lee H.W. Wild rats, laboratory rats, pet rats: global Seoul hantavirus disease revisited. *Viruses*. 2019; 11(7):652. DOI: 10.3390/v11070652.

3. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., Kurashova S.S., Balkina A.S., Tkachenko P.E., Kruger D.H., Klempa B. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12):2325–7. DOI: 10.3201/eid2512.181649.

4. Savitskaya T.A., Ivanova A.V., Isaeva G.Sh., Reshetnikova I.D., Trifonov V.A., Ziatdinov V.B., Serova I.V., Safronov V.A. [Assessment of epidemiological situation on hemorrhagic fever with renal syndrome around the world and in Russia, forecast for 2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):62–70. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-62-70.

5. Reynes J.M., Carli D., Boukezia N., Debruyne M., Herti S. Tula hantavirus infection in a hospitalized patient, France, June 2015. *Euro Surveill.* 2015; 20(50). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.50.30095.

6. Plyusnin A., Vapalahti O., Lankinen H., Lehtvaslainen H., Apekina N., Myasnikov Y., Kallio-Kokko H., Henttonen H., Lundkvist A., Brummer-Korvenkontio M., Gavrillovskaia I., Vaheri A. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. *J. Virol.* 1994; 68(12):7833–9. DOI: 10.1128/JVI.68.12.7833-7839.1994.

7. Yakimenko V.V., Dekonenko A.E., Mal'kova M.G., Kuz'min I.V., Tantsev A.K., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A. [Spread of hantaviruses in West Siberia]. *Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2000; 3:21–8.

8. Yashina L.N., Zaykovskaya A.V., Protopopova E.V., Babkin I.V., Malyshev B.S., Tovpinets N.N., Evstaf'ev I.L. [Tula hantavirus in Crimea]. *Molekulyarnaya genetika, Mikrobiologiya and Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2015; 4:38–41.

9. Castel G., Chevenet F., Razzauti M., Murri S., Marianneau P., Cosson J.F., Tordo N., Plyusnin A. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe. *Viruses*. 2019; 11(8):679. DOI: 10.3390/v11080679.

10. Plyusnin A., Morzunov S.P. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001; 256:47–75. DOI: 10.1007/978-3-642-56753-7_4.

11. Kariwa H., Yashimatsu K., Sawabe J., Yokota E., Arikawa J., Takashima I., Fukushima H., Lundkvist A., Shubin F.N., Isachkova L.M., Slonova R.A., Leonova G.N., Hashimoto N. Genetic diversities of hantaviruses among rodents in Hokkaido, Japan and Far East Russia. *Virus Res.* 1999; 59(2):219–28. DOI: 10.1016/S0168-1702(98)00141-5.

12. Yashina L.N., Abramov S.A., Dupal T.A., Danchinova G.A., Malyshev B.S., Hay J., Gu S.H., Yanagihara R. Hokkaido genotype of Puumala virus in the grey red-backed vole (*Myodes rufocanus*) and northern red-backed vole (*Myodes rutilus*) in Siberia. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 33:304–13. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.05.021.

13. Song K.J., Baek L.J., Moon S., Ha S.J., Kim S.H., Park K.S., Klein T.A., Sames W., Kim H.C., Lee J.S., Yanagihara R., Song J.W. Muju virus, a novel hantavirus harboured by the arvicolid rodent *Myodes regulus* in Korea. *J. Gen. Virol.* 2007; 88:3121–9. DOI: 10.1099/vir.0.83139-0.

14. Ge X.Y., Yang W.H., Pan H., Zhou J.H., Han X., Zhu G.J., Desmond J.S., Daszak P., Shi Z.L., Zhang Y.Z. Fugong virus, a novel hantavirus harbored by the small oriental vole (*Eothenomys eleusis*) in China. *Virol. J.* 2016; 13:27–33. DOI: 10.1186/s12985-016-0483-9.

15. Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., Shipulin G.A. Genetic diversity and geographic distribution of hantaviruses in Russia. *Zoon. Pub. Health.* 2009; 56(6-7):297–309. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01210.x.

16. Yashina L.N., Kuzina I.I., Malysheva T.V., Ivanov L.I., Khasanova S.S. [PCR test-system application for hemorrhagic fever with renal syndrome diagnosis and study of hantavirus genetic diversity]. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk [Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences]*. 2004; 8:40–3.

17. Dekonenko A., Yakimenko V., Ivanov A., Morozov V., Nikitin P., Khasanova S., Dzagurova T., Tkachenko E., Schmaljohn C. Genetic similarity of Puumala viruses found in Finland and western Siberia and of the mitochondrial DNA of their rodent hosts suggests a common evolutionary origin. *Infect. Genet. Evol.* 2003; 3:245–57.

18. Ivanova A.V., Safronov V.A., Popov N.V., Kozhanova O.I., Matveeva N.I., Kresova U.A., Chumachkova E.A., Pospelov M.V., Arkhipova G.N., Vyatkin I.N., Shcherbakova S.A., Kuttyrev V.V. [Epidemiological features of HFRS (hemorrhagic fever with renal syndrome) outbreak in the Saratov Region in 2019]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):78–85. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-78-85.

19. Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Denys C., Koivogui L., ter Meulen J., Krüger D.H. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5):838–40. DOI: 10.3201/eid1205.051487.

20. 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(10):2731–9. DOI:10.1093/molbev/msr121.

21. Jaaskelainen K.M., Kaukinen P., Minskaya E.S., Plyusnina A., Vapalahti O., Elliott R.M., Weber F., Vaheri A., Plyusnin A. Tula and Puumala hantavirus NSs ORFs are functional and the products inhibit activation of the interferon-beta promoter. *J. Med. Virol.* 2007; 79(10):1527–36. DOI: 10.1002/jmv.20948.

Authors:

Yashina L.N., Tregubchak T.V., Malyshev B.S., Smetannikova N.A., Grishchenko I.V., Dol'sky A.A., Shvalov A.N., Zaykovskaya A.V. State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Kazantsev A.V., Chekashov V.N., Krasovskaya T.Yu. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Яшина Л.Н., Трегубчак Т.В., Мальшев Б.С., Сметанникова Н.А., Грищенко И.В., Дольский А.А., Швалов А.Н., Зайковская А.В. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Казанцев А.В., Чекашов В.Н., Красовская Т.Ю. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

К ЮБИЛЕЮ СЕРГЕЯ ВЛАДИМИРОВИЧА БАЛАХОНОВА

11 декабря 2021 г. исполнилось 65 лет Сергею Владимировичу Балахонову, профессору, доктору медицинских наук, директору Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, члену редакционного совета журнала «Проблемы особо опасных инфекций».

С.В. Балахонов – один из ведущих ученых России в области молекулярной микробиологии и эпидемиологии особо опасных, зоонозных и природно-очаговых инфекций. Им получены приоритетные данные по плазмидному составу сибирских и монгольских штаммов чумного микроба, разработаны или адаптированы к особо опасным патогенам методические особенности молекулярной диагностики и геносистематики, ДНК-ДНК-гибридизации и другие. Сергей Владимирович Балахонов является автором свыше 500 научных публикаций, в том числе десяти монографий, под его руководством защищены восемь кандидатских и одна докторская диссертация.

Возглавляемый им Иркутский научно-исследовательский противочумный институт является научно-методическим центром и обеспечивает эпидемиологическое благополучие на огромной территории Сибирского и Дальневосточного федеральных



округов. В институте развиваются инновационные направления, проводятся совместные российско-монгольские исследования в трансграничных природных очагах чумы Сибири и Монголии. Институт принимал участие в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия массовых международных мероприятий и чрезвычайных ситуаций. В период пандемии COVID-19 выполняется большая работа по молекулярно-генетическому мониторингу возбудите-

ля новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, диагностике и изучению популяционного иммунитета населения.

За заслуги перед медицинской наукой и практическим здравоохранением С.В. Балахонов награжден орденом Пирогова, имеет ведомственные награды Российской Федерации и Монголии.

Редакционная коллегия и редакционный совет журнала «Проблемы особо опасных инфекций», коллектив Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока сердечно поздравляют С.В. Балахонova со знаменательной датой и желают ему доброго здоровья, счастья, благополучия и новых творческих успехов.

ПАМЯТИ ИРИНЫ АЛЕКСАНДРОВНЫ ЩИПЕЛЕВОЙ

4 ноября 2021 г. на 55-м году скоропостижно ушла из жизни Ирина Александровна Щипелева – ученый секретарь, начальник отдела научного и учебно-методического обеспечения Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института, кандидат биологических наук.

Ирина Александровна поступила на работу в институт в 1995 г., прошла трудовой путь от лабораторного служителя до старшего научного сотрудника. В 2005 г. защитила кандидатскую диссертацию «Экспериментальное обоснование преимуществ сочетанной специфической и экстренной профилактики чумы». В 2010 г. назначена на должность



ученого секретаря института, начальника отдела.

Ее отличали подлинный профессионализм, невероятное трудолюбие, целеустремленность, порядочность и честность. В памяти коллег Ирина Александровна всегда останется светлым, добрым, позитивным человеком.

Коллектив Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института, редакционная коллегия и редакционный совет журнала «Проблемы особо опасных инфекций» выражают глубокие соболезнования родным и близким Ирины Александровны.