

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

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

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

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

Выпуск 3

2022

САРАТОВ

**Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 29448**
Цена на издание за минимальный
подписной период – 686,52 руб.

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 издателя и редакции:
ФКУН Российский противочумный
институт «Микроб» Роспотребнадзора
410005, Саратов,
ул. Университетская, 46
E-mail: jour@microbe.ru
Сайт: <http://journal.microbe.ru>

Начальник
редакционно-издательского отдела
ФКУН Российский противочумный
институт «Микроб» Роспотребнадзора
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.
2022. Вып. 3. 174 с.

Подписано в печать 23.09.2022
Формат 60×84 1/8
Бумага мелованная
Печать офсетная
Усл. печ. л. 21,31
Заказ 3585-22

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

© Федеральное казенное учреждение науки
«Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»
Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека, 2022

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, академик РАН
(Сергиев Посад, Россия)
Гинцбург А.Л., докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)
Дятлов И.А., докт. мед. наук, академик РАН (Оболensk, Россия)
Куличенко А.Н., докт. мед. наук, академик 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)
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, член-корр. РАН (Москва, Россия)
Андаев Е.И., докт. мед. наук (Иркутск, Россия)
Бугоркова С.А., докт. мед. наук (Саратов, 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)
Шемакин И.Г., докт. биол. наук, профессор (Оболensk, Россия)
Щербакова С.А., докт. биол. наук (Саратов, Россия)

ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:

Красько А.Г., канд. мед. наук, доцент (Минск, Беларусь)
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

2022, Issue 3

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

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

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

Editorial Council

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

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

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

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

Borisevich S.V., Doctor of Biological Science,
Professor, 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,
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)

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,
Corresponding Member of the RAS (Moscow, Russia)

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

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

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>

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

Обзоры

- Буданова А.А., Шуковская Т.Н.** Исследования *in silico* на этапах конструирования современных средств иммунопрофилактики чумы (на примере субъединичных вакцин) 6
- Кузнецова Д.А., Рыкова В.А., Подладчикова О.Н.** Сидерофоры бактерий: структура, функции и роль в патогенезе инфекций 14
- Никифоров К.А.** Штаммы *Yersinia pestis* линии 1.ORI как этиологический агент III пандемии чумы 23
- Слудский А.А., Девдариани З.Л.** Рамнозопозитивные штаммы возбудителя чумы: вирулентность и эпидемиологическое значение 38

Оригинальные статьи

- Аюгин Н.И., Андаев Е.И., Никитин А.Я., Ханхареєв С.С., Истомина Т.Ф.** Классификация муниципальных образований Республики Бурятия по уровню заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом 45
- Борисевич Г.В., Кириллова С.Л., Шатохина И.В., Лебедев В.Н., Соловьев С.С., Сыромиятнникова С.И., Шагарова Н.В., Боярская Н.В., Левкович Н.Г., Соляник Д.А., Андрус А.Ф., Рубцов В.В., Кротков В.Т., Кулиш В.С., Суровяткина И.В., Кириллов В.Б., Ковальчук А.В., Пантюхов В.Б., Кутаев Д.А., Борисевич С.В.** Исследование методом проточной цитометрии клеточного иммунитета макак-резусов после экспериментального инфицирования вирусом SARS-CoV-2 53
- Горюнова П.А., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Соседова Е.А., Червякова Н.С., Кутырев В.В.** Прикаспийский песчаный природный очаг: филогенетическая история и происхождение штаммов *Yersinia pestis* 61
- Гуляев Ю.В., Мещанов В.П., Кац Б.М., Коплеватский Н.А., Лопатин А.А., Саяпин К.А., Ёлкин В.А., Комаров В.В., Байбурин В.Б., Рытик А.П.** Воздействие импульсным СВЧ-излучением на образцы пищевой продукции с целью увеличения показателей ее микробиологической безопасности и сроков хранения 70
- Забашта М.В., Пичурина Н.Л., Хаметова А.П., Забашта А.В., Орехов И.В., Добровольский О.П., Стахеев В.В., Фомина Е.С., Ковалев Е.В., Федченко А.В., Носков А.К.** Эпизоотия туляремии в популяции обыкновенной полевки в природном очаге степного типа на юго-востоке Ростовской области в 2020 году 75
- Казанцев А.В., Проскурякова М.В., Казакова Е.С., Осина Н.А., Швиденко И.Г., Микеров А.Н.** Антибиотикорезистентность уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с инфекциями мочевыводящих путей в урологическом стационаре клинической больницы Саратова 82
- Касьян Ж.А., Le Thi Lan Anh, Шарова И.Н., Vo Viet Cuong, Оглодин Е.Г., Trinh Van Toan, Голубев С.Н., Проскурякова М.В., Bui Thi Lan Anh, Hoang Duc Hau, Dang Thi Viet Huong, Pham Thi Ha Giang, Duong Van Nghia, Bui Thi Thanh Nga, Ляпин М.Н., Щербакова С.А.** Опыт использования мобильной лаборатории мониторинга и диагностики в Социалистической Республике Вьетнам 90

Reviews

- Budanova A.A., Shchukovskaya T.N.** *In silico* Research at the Stages of Designing Modern Means for Prevention of Plague (by the Example of Subunit Vaccines) 6
- Kuznetsova D.A., Rykova V.A., Podladchikova O.N.** Bacterial Siderophores: Structure, Functions, and Role in the Pathogenesis of Infections 14
- Nikiforov K.A.** *Yersinia pestis* Strains of the 1.ORI Line as Etiological Agent of the Plague Pandemic III 23
- Sludsky A.A., Devdariani Z.L.** Rhamnose-Positive Strains of Plague Agent: Virulence and Epidemiological Significance 38

Original articles

- Ayugin N.I., Andaev E.I., Nikitin A.Ya., Khankhareev S.S., Istomina T.F.** Classification of Municipalities in the Republic of Buryatia by the Level of Tick-Borne Viral Encephalitis Incidence 45
- Borisevich G.V., Kirillova S.L., Shatokhina I.V., Lebedev V.N., Solov'ev S.S., Syromyatnikova S.I., Shagarova N.V., Boyarskaya N.V., Levkovich N.G., Solyanik D.A., Andrus A.F., Rubtsov V.V., Krotkov V.T., Kulish V.S., Surovyatkina I.V., Kirillov V.B., Koval'chuk A.V., Pantyukhov V.B., Kutaev D.A., Borisevich S.V.** The Flow Cytometry Study of Cellular Immunity in Rhesus Monkeys after Experimental Infection with SARS-CoV-2 Virus 53
- Goryunova P.A., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Sosedova E.A., Chervyakova N.S., Kutyrev V.V.** Caspian Sandy Natural Focus: Phylogenetic History and Origin of *Yersinia pestis* Strains 61
- Gulyaev Yu.V., Meshchanov V.P., Kats B.M., Koplevatsky N.A., Lopatin A.A., Sayapin K.A., Elkin V.A., Komarov V.V., Bayburin V.B., Rytik A.P.** Exposure of Food Samples to Pulsed Microwave Radiation to Increase their Microbiological Safety and Shelf Life 70
- Zabashta M.V., Pichurina N.L., Khametova A.P., Zabashta A.V., Orekhov I.V., Dobrovolsky O.P., Stakheev V.V., Fomina E.S., Kovalev E.V., Fedchenko A.V., Noskov A.K.** Epizooty of Tularemia, Detected in the Population of the Common Vole in the Natural Focus of Steppe Type in the South-East of the Rostov Region in 2020 75
- Kazantsev A.V., Proskuryakova M.V., Kazakova E.S., Osina N.A., Shvidenko I.G., Mikerov A.N.** Antibiotic Resistance of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections at the Urological Inpatient Facility of the Saratov Clinical Hospital 82
- Kas'yan Zh.A., Le Thi Lan Anh, Sharova I.N., Vo Viet Cuong, Oglochin E.G., Trinh Van Toan, Golubev S.N., Proskuryakova M.V., Bui Thi Lan Anh, Hoang Duc Hau, Dang Thi Viet Huong, Pham Thi Ha Giang, Duong Van Nghia, Bui Thi Thanh Nga, Lyapin M.N., Shcherbakova S.A.** Experience in Using Mobile Laboratory for Monitoring and Diagnostics in the Socialist Republic of Vietnam 90

- Кутырев В.В., Щербаклова С.А., Карнаухов И.Г., Касьян Ж.А., Шиянова А.Е., Горбунов В.А., Красько А.Г., Лешкевич А.Л., Федорович Е.В., Семизон П.А., Рустамова Л.М., Петкевич А.С., Ерубаев Т.К., Аязбаев Т.З., Турегелдиева Д.А., Ковалева Г.Г., Бердиев С.К., Усенбаев Н.Т., Казыбаева Ж.С. Система мониторинга и реагирования на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера в странах СНГ 95
- Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Якушева О.А., Алексеева Л.П., Водопьянов С.О., Ежова М.И., Носков А.К. Изучение диапазона изменчивости по агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных при мониторинговых исследованиях 107
- Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В., Захарова И.Б., Виктор Д.В. Анализ резистентности у *Burkholderia pseudomallei* к бензалкония хлориду и антибиотикам 115
- Останкова Ю.В., Давыденко В.С., Шемелев А.Н., Зуева Е.Б., Виrolainen П.А., Тотолан Арег А. Определение тропизма ВИЧ у лиц с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области 120
- Савицкая Т.А., Трифонов В.А., Милова И.В., Исаева Г.Ш., Решетникова И.Д., Серова И.В., Лопушов Д.В., Зиятдинов В.Б. Сибирская язва в Республике Татарстан (1920–2020 гг.) 129
- Саяпина Л.В., Осина Н.А., Нарышкина Е.А., Федоров А.В., Краснов Я.М., Давыдов Д.С., Бондарев В.П. Совершенствование подходов по верификации вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения 137
- Сынгеева А.К., Остык А.С., Куликалова Е.С., Мазепа А.В., Наумова К.В., Балахоннов С.В. Эффективность применения MALDI-ToF масс-спектрометрии при идентификации штаммов *Francisella tularensis* 145
- Челдышова Н.Б., Девдариани З.Л. Сравнительный анализ экспрессии основных генов вирулентности у различных штаммов *Vibrio cholerae* O1 151
- Чирсков П.Р., Bui T.L.A., Устинов Д.В., Виктор А.Д., Захарова И.Б. Сравнительный анализ потенциальных детерминант резистентности к аминогликозидам у штаммов *Burkholderia pseudomallei* с различным уровнем чувствительности к гентамицину 158
- Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Томилов А.А., Боднев С.А., Болдырев Н.Д., Овчинникова А.С., Зайковская А.В., Таранов О.С., Ивлева Е.К., Пьянков О.В., Максютон Р.А. Патогенность вызывающих обеспокоенность вариантов вируса SARS-CoV-2 для сирийского хомячка 164
- Краткие сообщения**
- Низкородова А.С., Мальцева Э.Р., Бердыгулова Ж.А., Найзабаева Д.А., Куатбекова С.А., Жигайлов А.В., Абдолла Н., Машжан А.С., Ахметоллаев И.А., Скиба Ю.А., Мамадалиев С.М. Детекция *Bacillus anthracis* по генам профага lambda_Ba03 посредством ПЦР в реальном времени 170
- Информация**
- О Международном симпозиуме “Yersinia 14” и XVI Межгосударственной научно-практической конференции по вопросам санитарной охраны территории и снижения риска распространения чумы 173
- О проведении XVI заседания Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств – участников Содружества Независимых Государств от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней 174
- Kutyrev V.V., Shcherbakova S.A., Karnaukhov I.G., Kas'yan Zh.A., Shiyanova A.E., Gorbunov V.A., Kras'ko A.G., Leshkevich A.L., Fedorovich E.V., Semizhon P.A., Rustamova L.M., Petkevich A.S., Erubaev T.K., Ayazbaev T.Z., Turegeldieva D.A., Kovaleva G.G., Berdiev S.K., Usenbaev N.T., Kazybaeva Zh.S. System of Monitoring and Response to Public Health Emergencies of Sanitary-Epidemiological Character in the CIS Countries 95
- Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Vodop'yanov S.O., Ezhova M.I., Noskov A.K. Assessment of the Variation Range of Agglutinability in *Vibrio cholerae* Strains Isolated in the Course of Monitoring Studies 107
- Luchinin D.N., Molchanova E.V., Zakharova I.B., Viktorov D.V. Assessment of Resistance in *Burkholderia pseudomallei* to Benzalkonium Chloride and Antibiotics 115
- Ostankova Yu.V., Davydenko V.S., Shchemelev A.N., Zueva E.B., Virolainen P.A., Totolyan Areg A. Determination of HIV Tropism in Patients with Antiretroviral Therapy Failure in Arkhangelsk Region 120
- Savitskaya T.A., Trifonov V.A., Milova I.V., Isaeva G.Sh., Reshetnikova I.D., Serova I.V., Lopushov D.V., Ziatdinov V.B. Anthrax in the Republic of Tatarstan (1920–2020) 129
- Sayapina L.V., Osina N.A., Naryshkina E.A., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M., Davydov D.S., Bondarev V.P. Improvement of Approaches to the Verification of the Vaccine Strain *Francisella tularensis* 15 NIEG during Long-Term Storage 137
- Syngeeva A.K., Ostyak A.S., Kulikalova E.S., Mazepa A.V., Naumova K.V., Balakhonov S.V. The Effectiveness of MALDI-ToF Mass Spectrometry in Identification of *Francisella tularensis* Strains 145
- Cheldyshova N.B., Devdariani Z.L. Comparative Analysis of Expression of the Main Virulence Genes in Various *Vibrio cholerae* O1 Strains 151
- Chirskov P.R., Bui T.L.A., Ustinov D.V., Viktorov A.D., Zakharova I.B. Comparative Analysis of Potential Determinants of Resistance to Aminoglycosides in *Burkholderia pseudomallei* Strains with Different Level of Sensitivity to Gentamicin 158
- Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Tomilov A.A., Bodnev S.A., Boldyrev N.D., Ovchinnikova A.S., Zaikovskaya A.V., Taranov O.S., Ivleva E.K., P'yankov O.V., Maksyutov R.A. Pathogenicity of the SARS-CoV-2 Virus Variants of Concern for the Syrian Golden Hamster 164
- Brief communications**
- Nizkorodova A.S., Mal'tseva E.R., Berdygulova Zh.A., Naizabaeva D.A., Kuatbekova S.A., Zhigailov A.V., Abdolla N., Mashzhan A.S., Akhmetollaev I.A., Skiba Yu.A., Mamadaliev S.M. Real-Time PCR Detection of *Bacillus anthracis* by Lambda_Ba03 Prophage Genes 170
- Information**
- On International Symposium “Yersinia 14” and XVI Interstate Scientific and Practical Conference on the Sanitary Protection of the Territory and Reducing the Risk of Spread of Plague 173
- On holding the XVI meeting of Coordinating Council on Sanitary Protection of the Territory of the Member-States of the CIS from Importation and Spread of Particularly Dangerous Infectious Diseases 174

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-6-13

УДК 616.98:579.842.23

А.А. Буданова, Т.Н. Щуковская

Исследования *in silico* на этапах конструирования современных средств иммунопрофилактики чумы (на примере субъединичных вакцин)

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

Цель обзора – проанализировать результаты отечественных и зарубежных исследователей по разработке современных препаратов для специфической профилактики чумы и показать возможности применения биоинформационного анализа на этапах конструирования для создания эффективной и безопасной вакцины. Работа по созданию эффективной чумной вакцины нового поколения затруднена ввиду нескольких факторов, связанных прежде всего с наличием у чумного микроба механизмов уклонения от иммунной системы макроорганизма, а также большого числа детерминант патогенности. Благодаря разработке подходов, основанных на исследованиях *in silico*, наблюдается прогрессивное развитие вакцинных технологий, основанных, прежде всего, на применении важнейших иммуногенов чумного микроба (F1 и V-антиген). В качестве актуальных способов применения биоинформационного анализа данных при разработке способов повышения эффективности защиты при вакцинации субъединичными препаратами рассматриваются исследования, направленные на улучшение антигенных характеристик F1 и LcrV, а также работы по биоинформационному поиску и анализу дополнительных перспективных компонентов для включения в состав субъединичных вакцин.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, субъединичные вакцины, F1, V-антиген, исследования *in silico*, протективные антигены чумного микроба.

Корреспондирующий автор: Буданова Ангелина Андреевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Буданова А.А., Щуковская Т.Н. Исследования *in silico* на этапах конструирования современных средств иммунопрофилактики чумы (на примере субъединичных вакцин). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:6–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-6-13
Поступила 21.10.2021. Принята к публ. 26.10.2021.

A.A. Budanova, T.N. Shchukovskaya

In silico Research at the Stages of Designing Modern Means for Prevention of Plague (by the Example of Subunit Vaccines)

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

Abstract. The purpose of this review was to analyze the findings of domestic and foreign researchers on the development of modern drugs for the specific prevention of plague and to illustrate the possibilities of using bioinformatics analysis at the design stages to create an effective and safe vaccine. Work on the creation of an effective new-generation plague vaccine is hampered by several factors associated primarily with the presence of mechanisms of evasion from the immune system of the macroorganism, as well as a large number of pathogenicity determinants in the plague agent. Due to the development of approaches that are based on *in silico* studies, there is a progressive development of vaccine technologies oriented primarily to the use of the most important immunogens of the plague microbe (F1 and V antigen). Studies aimed at improving the antigenic properties of F1 and LcrV, as well as work on bioinformatic search and analysis of additional promising components to be included in the composition of subunit vaccines are considered as topical applications of bioinformatics data analysis in developing the tools for enhancing the effectiveness of protection through vaccination with subunit preparations.

Key words: *Yersinia pestis*, subunit vaccines, F1, V-antigen, *in silico* studies, protective antigens of the plague microbe.

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

Corresponding author: Angelina A. Budanova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Budanova A.A., Shchukovskaya T.N. *In silico* Research at the Stages of Designing Modern Means for Prevention of Plague (by the Example of Subunit Vaccines). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:6–13. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-6-13
Received 21.10.2021. Accepted 26.10.2021.

Budanova A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5092-432X>

Shchukovskaya T.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8995-0895>

Одной из актуальных проблем общественно-го здравоохранения является защита населения от вновь возникающих, а также возвращающихся инфекций, к которым, в частности, относится чума,

представляющая собой особо опасное природно-очаговое зоонозное заболевание.

В соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилак-

ке инфекционных болезней», *Yersinia pestis* относится к I группе патогенности. Согласно классификации Центра по контролю и предотвращению болезней в США, возбудитель чумы принадлежит к патогенам категории А, что характеризует микроорганизм как наиболее опасный и вероятный агент биотерроризма [1]. Аэрогенный путь заражения *Y. pestis* приводит к развитию легочной формы болезни, для которой характерны высокая летальность и быстрое распространение. Реальным инструментом противостояния инфекции можно считать эффективную вакцину. К сожалению, несмотря на долгую историю существования природных очагов чумы, лицензированная безопасная и эффективная вакцина от этой инфекции отсутствует. На территории Российской Федерации, в Республике Казахстан, Китае уже более полувека применяют вакцину чумную живую. Исторические корни этого препарата связаны с вирулентным штаммом, выделенным в 1926 г. G. Girard и J. Robic на Мадагаскаре [2]. Несмотря на существенные достоинства вакцин на базе ослабленных штаммов чумного микроба, ВОЗ ориентируется на вакцины нового поколения, в основе разработок которых лежат современные методы и технологии [3, 4]. Среди факторов, ограничивающих применение живых противочумных вакцин, указывается, в частности, их высокая реактогенность [5]. Основные требования, предъявляемые ВОЗ к современным вакцинам, можно сформулировать следующим образом: 1) препараты должны содержать только полностью охарактеризованные вещества, для которых установлен механизм действия; 2) эффективно защищать от заражения любым вирулентным штаммом соответствующего микроорганизма; 3) не вызывать токсического воздействия или различных степеней тяжести побочных действий на макроорганизм [6].

Несмотря на то, что список факторов патогенности и кандидатов на их роль постоянно пересматривается [7], число антигенов, обладающих протективными свойствами, невелико [8]. Внедрение в иммунологические исследования новых методов и подходов создает предпосылки для всестороннего исследования компонентов, перспективных в качестве основных составляющих профилактических препаратов нового поколения. Актуальными представляются исследования, нацеленные на поиск новых антигенов чумного микроба, применение которых будет целесообразным при разработке современных вакцин, а также изучение их значимости во взаимодействии патогена с хозяином с позиций структурной биологии. Ключевая роль в данной области исследований отводится методам биоинформационного анализа данных, позволяющим осуществлять исследование *in silico* пространственной структуры белков по их аминокислотным последовательностям.

Исследования аминокислотных последовательностей иммуогенных антигенов *in silico*. Существует два основных направления применения инструментов биоинформатики при разработке ди-

зайна вакцин: 1) аннотация геномов патогенных микроорганизмов, аннотация генома хозяина, статистический анализ экспериментов с иммунологическими микрочипами; 2) компьютерный анализ иммунологических проблем, предсказание эпитопов. По мнению D.R. Flower *et al.* [9], один из очевидных и простых способов идентифицировать потенциальные новые антигены – поиск сходства последовательностей, основанный на выравнивании. Обширный теоретический материал в совокупности с экспериментальными данными является основой для создания баз данных по функциональной иммунологии, среди которых особого внимания заслуживают базы данных: AntiJen [10], ранее известная как JenPep [11, 12], и IEDB [13]. AntiJen объединяет обширные данные, большая часть из которых не хранится в других базах данных. Кроме информации о связывании МНС и Т-клеток, AntiJen дополнительно архивирует эпитопы В-клеток, а также включает в себя значительное число количественных параметров: кинетических, термодинамических и функциональных. База данных IEDB значительно более обширна, чем другие эквивалентные системы баз данных, и использует данные 13 специализированных проектов по секвенированию эпитопов. Однако, как и AntiJen, IEDB является неполной базой данных в отношении иммуогенных антигенов. В качестве примеров антиген-ориентированных баз данных можно привести AntigenDB [14], содержащую информацию более чем о 500 антигенах, и VIOLIN [15], содержащую загруженную с PubMed информацию по вакцинам, а также предлагающую различные инструменты для анализа представленных данных. Указанная база данных содержит информацию о 4184 вакцинах, разработанных против 208 патогенных для человека и животных микроорганизмов, а также против 8 заболеваний, в основе которых лежат разного рода аутоиммунные нарушения.

Несмотря на тот факт, что большинство алгоритмов использует выравнивание последовательностей для идентификации антигенов, данный подход не лишен и существенных недостатков, прежде всего связанных с дивергентной и конвергентной эволюцией, объясняющей, в частности, случаи, когда белки, лишенные очевидного сходства последовательностей, могут иметь сходные структуры и биологические свойства [16]. В качестве альтернативного подхода в работе I. Doytchinova *et al.* [17] предложен метод анализа белковых последовательностей, основанный на авто- и кросс-ковариационном преобразовании анализируемых аминокислотных последовательностей в однородные векторы равной длины, разработанном S. Wold *et al.* [18]. Модели распознавания протективных антигенов на базе основных химических свойств аминокислотных последовательностей реализованы на сервере для прогнозирования протективных антигенов и субъединичных вакцин VaxiJen [17]. На указанный сервер возможна загрузка как отдельной аминокислотной последовательности интересу-

ющего белка, так и файла, содержащего информацию о нескольких аминокислотных последовательностях, представленных в формате fasta. На странице результатов для каждого анализируемого белка в долях от единицы указывается вероятность проявления данной последовательности антигенных свойств и информация о статусе антигена («вероятный антиген» и «вероятный неантиген»). Этот инструмент можно применять как отдельно, так и в сочетании с другими инструментами биоинформатики, используемыми в области обратной вакцинологии.

Актуальной задачей в области обратной вакцинологии является поиск и анализ потенциальных аллергенов в связи с тем, что одной из причин возникновения поствакцинальных осложнений различной тяжести является аллергия [19]. В данном направлении исследований интерес представляет программа Allpred, анализирующая пространственную структуру заданной последовательности аминокислот, а также их физико-химические свойства. Для отнесения анализируемого белка к аллергенам используется параметр DF, принимающий значения от 0 до 1. Заключение об отнесении протеина к аллергенам можно сделать на основании значений DF выше определенного порога [20]. Применение программы Allpred позволило провести анализ 3256 белков вакцинного штамма *Y. pestis* и выявить среди них 170 белков со свойствами потенциальных аллергенов, открывая новые перспективы как по направлению конструирования безопасных противочумных вакцин, так и методов оценки их эффективности [19].

Методы обратной вакцинологии в исследовании эпитопов иммуогенных молекул. Многие инструменты иммуноинформатики, предназначенные для прогнозирования Т- и В-клеточных иммунных эпитопов, разработаны еще в 1980-х гг. [21], что явилось предпосылкой для создания нового направления в рамках работ по конструированию рационального дизайна вакцинных препаратов – обратной вакцинологии, представляющей собой новую стратегию разработки вакцин, начальным этапом которой является прогнозирование предполагаемых вакцин-кандидатов путем анализа *in silico*.

Впервые обратная вакцинология применена при разработке вакцин против *Neisseria meningitidis* серогруппы В [22]. С применением методов иммуноинформатики стало возможным прогнозирование *in silico* как эпитопов В-, так и Т-клеток, задействованных в формировании адаптивного иммунного ответа. Программное обеспечение, ориентированное на поиск и анализ антигенов, распознаваемых молекулами МНС, включает в себя TEpredict, CTLPred, nHLAPred, ProPred-I, MAPPP, SVMHC, GPS-MBA, PREDIVAC, NetMHC, NetCTL, MHC2 Pred, IEDB, BIMAS, SVMHC, POPI, Epitopemap, iVAX, FREDIMAS, Rankpep; в то время как BCPREDS, BepiPred, BEpro, ABCpred, Vcepred, IgPred и BCEP осуществляют поиск линейных В-клеточных эпи-

топов [23]. Комплексное применение методов биоинформационного анализа при исследовании как анализируемой последовательности, так и особенностей ее структуры позволяет ближе подойти к созданию эффективной и безопасной вакцины, обеспечивающей защиту от широкого спектра штаммов изучаемого патогена. Именно такой подход реализован J.E. Cornick *et al.* при разработке универсальной вакцины-кандидата против *Streptococcus pneumoniae* серотипа 1 [24]. С применением анализа *in silico* оценена распространенность среди культур *S. pneumoniae* серотипа 1, выделенных на территории 26 стран, семи белков-кандидатов в вакцинные препараты (CbpA, PcpA, PhtD, PspA, SP0148, SP1912, SP2108). Идентифицированы множественные аллельные варианты этих белков, при этом разные аллельные варианты доминировали на разных континентах. Авторы работы пришли к выводу, что последовательности SP0148, SP1912, SP2108 являются высококонсервативными и обнаружены у всех изолятов, что может способствовать созданию универсальной вакцины против пневмококка.

Сложности конструирования противочумных вакцинных кандидатов и пути их преодоления. Создание противочумных вакцин нового поколения не представляется возможным без привлечения современных генно-инженерных технологий. Исследования, направленные на разработку средств для специфической профилактики чумы, в настоящее время ведутся по нескольким направлениям, в основе которых лежат работы, связанные как с применением современных методов аттенуации вирулентных штаммов *Y. pestis*, созданием вакцин на основе отдельных иммуногенов чумного микроба или их комплексов (субъединичных вакцин), так и с конструированием векторных противочумных вакцин и ДНК-вакцин. Однако работы по созданию эффективной противочумной вакцины осложняются рядом объективных причин, прежде всего связанных с наличием у чумного микроба большого числа детерминант патогенности, нарушающих развитие адаптивного иммунитета и оказывающих противодействие защитным механизмам макроорганизма [25]. Патоген обладает механизмом подавления процесса активации Т-лимфоцитов, а также демонстрирует способность выживать и реплицироваться внутри макрофагов и нейтрофилов [26].

В 2018 г. ВОЗ сообщила о 17 зарегистрированных кандидатах в противочумные вакцины, находящихся на разных этапах клинических испытаний [27]. Согласно базе данных VIOLIN (<http://www.violinet.org/stat.php>), по состоянию на май 2021 г. общее количество противочумных вакцин, а также кандидатов в вакцинные препараты составляет 29 (включая живую вакцину, полученную на основе аттенуированной культуры *Y. pestis* EV76, а также инактивированную чумную вакцину USP, ранее применявшуюся для вакцинации воинского контингента в период войны во Вьетнаме), из которых 11 относятся к субъ-

единичным вакцинам, 8 – к разрабатываемым живым противочумным вакцинам, 5 – к противочумным вакцинным кандидатам, создаваемым на основе рекомбинантных вирусных векторов, 2 – являются препаратами, созданными на основе убитых или инактивированных клеток возбудителя, 3 препарата представляют собой разрабатываемые ДНК-вакцины. Таким образом, одну из главенствующих позиций занимают кандидатные препараты на основе рекомбинантных антигенов чумного микроба.

Подавляющее большинство субъединичных противочумных вакцин конструируется на основе антигенов F1 и LcrV [27], что делает эти два антигена ключевыми составляющими практически всех разрабатываемых чумных вакцин нового поколения [28]. Актуальность применения данных антигенов в качестве основных иммуногенных компонентов при конструировании химических противочумных вакцин ранее подтверждена в многочисленных работах зарубежных авторов, показавших, что указанные структуры чумного микроба активируют дендритные клетки макроорганизма, способствуя тем самым формированию клеточного противочумного иммунитета [29]. F1 является основным белковым компонентом псевдокапсулы чумного микроба и незаменимым фактором вирулентности, LcrV представляет собой мультифункциональный белок, необходимый для функционирования транспортной системы III типа *Y. pestis* и доставки эффекторных белков в клетки иммунной системы [30]. Наиболее перспективными вакцинными кандидатами в данном направлении являются запатентованные препараты, разработанные правительственными агентствами США, Великобритании и Китая: rF1-V, RypVax и SV1 [30].

Вопреки тому факту, что эффективность препаратов на основе LcrV показана при моделировании как бубонной, так и легочной форм чумы у экспериментальных животных при заражении вирулентными штаммами *Y. pestis* [31], необходимо принимать во внимание обнаруженные в составе V-антигена эпитопы, ассоциированные с иммуносупрессией. В работах R.R. Brubaker *et al.* [32] показано, что LcrV стимулирует иммунные клетки к высвобождению иммуносупрессивного интерлейкина 10 (IL-10) и предотвращает высвобождение провоспалительных цитокинов, таких как интерферон- γ (IFN γ) или фактор некроза опухолей- α (TNF α), что в конечном итоге может привести к развитию LcrV-нейтрализующих иммунных ответов [33]. Таким образом, с учетом описанных иммуномодулирующих свойств V-антигена, применение вакцин, созданных на основе очищенного или рекомбинантного V-антигена, может вызывать определенные опасения относительно безопасности данных препаратов для людей [34], что указывает на особую значимость исследований, направленных на поиск участков молекулы V-антигена, обладающих пониженными иммуномодулирующими свойствами. В качестве такой молекулы выступает вариант V-антигена rV10, в структуре которого отсутству-

ет последовательность аминокислот с 271 по 300, расположенная на С-конце, что способствует значительному снижению способности индуцировать IL-10 и подавлению синтеза провоспалительных цитокинов [34]. Позднее в экспериментах на мышах линии BALB/c показана 100 % протективность данного препарата в отношении вирулентного штамма *Y. pestis* CO92, в противоположность полноразмерному препарату rLcrV, обеспечивающему протективный эффект в 70 % случаев [35]. Чуть позднее 100 % эффективность этого препарата в отношении бубонной и легочной форм чумы продемонстрирована на макаках *Сynomolgus*. Вакцина на основе усеченного V-антигена запатентована Чикагским университетом и названа V10 [30].

Одна из проблем при конструировании субъединичных вакцин и анализе их протективного эффекта связана и с наличием гипервариабельных областей в структуре LcrV. Так, анализ конформационного сегмента (участка) LcrV, включающего в себя остатки аминокислотных последовательностей с 218 по 233, а также аминокислотного остатка, расположенного в 255-м положении, показал наличие не менее пяти вариантов V-антигена. Опираясь на представленные в работе [36] данные, можно резюмировать, что вакцины на основе V-антигена должны включать несколько вариантов этого антигена, чтобы увеличить эффективность препаратов.

К существенным недостаткам субъединичных вакцин на основе F1 и LcrV можно отнести краткосрочный защитный эффект, основанный на активации гуморального иммунного ответа, что делает необходимым проведение бустерной иммунизации [29, 37]. Длительного протективного эффекта невозможно достичь без активации клеточного звена иммунитета, что, несомненно, требует привлечения современных методов исследования биомолекул, позволяющих предварительно оценить иммуногенность целевого антигена, а также выявить гипотетические В- и Т-клеточные эпитопы в его структуре. Полногеномное секвенирование, методы биоинформатики и протеомный анализ данных позволяют идентифицировать антигены *Y. pestis*, способные стимулировать протективный Т-клеточный ответ [7], что в дальнейшем должно способствовать подбору оптимальных мишеней универсальной противочумной вакцины нового поколения.

Применение исследований *in silico* для включения в состав чумных вакцин дополнительных иммуногенных антигенов. Одним из перспективных направлений в рамках работ по конструированию современных противочумных вакцин является поиск дополнительных защитных антигенов *Y. pestis*, в числе которых рядом авторов указывались как поверхностные структуры, так и эффекторные молекулы [38, 39].

В постгеномный период для поиска, анализа и всестороннего изучения перспективных кандидатов в состав разрабатываемых вакцинных препаратов

нового поколения все чаще применяются современные методы исследования биомолекул. Центральное место отводится методам биоинформационного и протеомного анализа. Иммуноинформационные исследования позволяют провести оценку антигенности, токсичности и аллергенных свойств предсказанных иммунореактивных эпитопов целевых молекул. Однако, несмотря на кажущуюся простоту, экспрессность и универсальность этого подхода, не стоит забывать и о подтверждении данных, полученных *in silico*, результатами экспериментов *in vivo*. Не менее важной задачей в настоящее время является картирование иммунодоминантных эпитопов, ассоциированных с активацией Т-клеточного звена иммунитета как важного компонента противочумного иммунитета. Вопреки тому факту, что F1 и LcrV являются основными компонентами практически всех субъединичных вакцин, данные антигены не являются доминантными антигенами, стимулирующими Т-клеточный иммунитет человека, что указывает на существование других белков, значимых для активации клеточного звена иммунитета [7]. Принимая во внимание сложность бактериальных протеомов, вводятся определенные критерии, позволяющие изучать отдельные интересующие белки или их подмножества, что в итоге существенным образом ограничивает охват исследований. Так, большинство обнаруженных *in silico* эпитопов Т-клеток относятся именно к антигенам F1 и LcrV. Одним из перспективных антигенов чумы, несущим в своем составе Т-клеточный эпитоп, является эффектор YopE [40], С-концевой домен которого (остатки от 100 до 219) обладает активностью GTPаза-активирующего белка (GTPase-activating protein, GAP). Помимо домена GAP, в структуре YopE присутствует сигнальная последовательность (остатки с 1 по 15) и шаперон-связывающий домен (остатки с 23 до 78), содержащий домен мембранной локализации (membrane localization domain, MLD) (аминокислотные остатки 53–79), принимающий участие в связывании с мембранами клеток хозяина транслоцированного YopE [41]. По данным, опубликованным в работе J.S. Lin *et al.*, пептид YopE_{69–77} является доминантным антигеном, распознаваемым *Y. pestis*-специфическими CD8 Т-клетками у мышей C57BL/6 [40]. В представленном исследовании мышей дважды интраназально вакцинировали ослабленным штаммом *Y. pestis* D27-pLpxL, полученным путем трансформации штамма pgm-дефектного варианта штамма *Y. pestis* KIM – *Y. pestis* D27 (pCD1+, pRCP+, pMT+) плазмидой pLpxL [42] с последующим заражением вирулентным штаммом *Y. pestis* D27 [40]. Установлено, что интраназальная иммунизация YopE_{69–77} доминантным Т-клеточным эпитопом CD8 белка *Y. pestis* YopE обеспечивает опосредованную CD8 Т-клетками защиту от легочной формы чумы мышей линии C57BL/6. Показано, что YopE_{69–77}-иммунизированные мыши могут выдерживать нагрузку до 200 MLD, а также отмечено, что иммунизированные мыши значительно лучше защи-

щены от интраназального заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* CO92 [43].

В 2017 г. в работе A. Zvi *et al.* [44] проведена оценка 1532 отобранных аминокислотных последовательностей на их способность вызывать клеточно-опосредованный иммунный ответ. Указанные пептиды относились к 555 различным белкам. Тщательный анализ топологии представленных белков выявил локализацию предполагаемых CTL-эпитопов. Более половины из 555 белков, содержащих предсказанные CTL-эпитопы, представлены мембранными белками. Эти данные согласуются с ранее полученными сведениями о гидрофобной природе последовательностей CTL-эпитопов [45]. По результатам проведенного анализа INF γ ELISpot только 11,6 % пептидов среди представленной выборки продемонстрировали способность вызывать клеточно-опосредованный ответ, что привело к идентификации 178 новых иммуногенных эпитопов CTL, что открывает исследователям дальнейшие перспективы по успешной разработке субъединичных противочумных вакцин [44].

Таким образом, применение методов биоинформационного анализа становится одним из актуальных направлений при конструировании возможных кандидатов в вакцинные препараты. Благодаря созданным базам данных, архивирующим информацию о важнейших биохимических, биофизических и иммунологических свойствах огромного пула биологических молекул, методы биоинформационного анализа хорошо зарекомендовали себя на этапе поиска новых иммуногенных мишеней, перспективных в качестве как основных, так и дополнительных компонентов при конструировании противочумных вакцин нового поколения. Проведение анализа *in silico* дает возможность предварительно оценить протективные и иммуногенные свойства целевых компонентов, а также тип иммунного ответа на введение антигена модельным объектам. Однако применение данных методов не отменяет, а лишь дополняет классические методы иммунологии. Подход, основанный на совокупном применении указанных методов исследования, будет способствовать более детальному анализу перспективных антигенов чумного микроба, а также лучшему пониманию особенностей взаимодействия патогена с иммунной системой хозяина, что в конечном итоге должно способствовать созданию эффективной противочумной вакцины нового поколения.

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

Список литературы

1. Книрель Ю.А., Федорова В.А., Анисимов А.П. В борьбе за контролем над чумой. Прошлое и настоящее «черного мора». *Вестник Российской академии наук*. 2011; 81(1):33–42.
2. Дентовская С.В., Копылов П.Х., Иванов С.А., Агеев С.А., Анисимов А.П. Молекулярные основы вакцинопрофилактики чумы. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 3:3–12.
3. Cui Y., Yang X., Xiao X., Anisimov A.P., Li D., Yan Y., Zhou D., Rajerison M., Carniel E., Achtman M., Yang R.,

- Song Y. Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (*Yersinia pestis* EV76 lineage) during laboratory passages in different countries. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 26:172–9. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.05.023.
4. WHO – Plague vaccines workshop April 23 2018 [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/blueprint/what/standards-standards/Plague_vaccines_workshop-23-april-2018/en/ (дата обращения 20.03.2021).
5. Sun W., Singh A.K. Plague vaccine: recent progress and prospects. *Vaccines*. 2019; 4:11. DOI: 10.1038/s41541-019-0105-9.
6. Семакова А.П., Кудрявцева О.М., Попова П.Ю., Комиссаров А.В., Микшиш Н.И. Стабилизация путем лиофилизации иммуногенных антигенов *Bacillus anthracis* в составе прототипа рекомбинантной вакцины против сибирской язвы. *Биотехнология*. 2017; 33(3):57–65. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-57-65.
7. Красильникова Е.А., Трунякова А.С., Вагайская А.С., Светоч Т.Э., Шайхутдинова Р.З., Дентовская С.В. Подбор новых молекулярных мишеней для оптимизации вакцинопрофилактики и терапии чумы. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(2):265–82. DOI: 10.15789/2220-7619-SNM-1254.
8. Микшиш Н.И., Кутырев В.В. Современное состояние проблемы разработки вакцин для специфической профилактики чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 1:50–63. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-50-63.
9. Flower D.R., Davies M.N., Doytchinova I.A. Identification of candidate vaccine antigens *in silico*. In: Flower D.R., Perrie Y., editors. *Immunomic Discovery of Adjuvants and Candidate Subunit Vaccines*. New York: Springer; 2013. P. 39–71. DOI: 10.1007/978-1-4614-5070-2_3.
10. Toseland C.P., Clayton D.J., McSparron H., Hemsley S.L., Blythe M.J., Paine K., Doytchinova I.A., Guan P., Hattotuwa G.A., Flower D.R. AntiJen: a quantitative immunology database integrating functional, thermodynamic, kinetic, biophysical, and cellular data. *Immunome Res.* 2005; 1(1):4. DOI: 10.1186/1745-7580-1-4.
11. McSparron H., Blythe M.J., Zygori C., Doytchinova I.A., Flower D.R. JenPep: a novel computational information resource for immunobiology and vaccinology. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2003; 43(4):1276–87. DOI: 10.1021/ci030461e.
12. Blythe M.J., Doytchinova I.A., Flower D.R. JenPep: a database of quantitative functional peptide data for immunology. *Bioinformatics*. 2002; 18(3):434–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/18.3.434.
13. Vita R., Zarebski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Salimi N., Damle R., Sette A., Peters B. The immune epitope database 2.0. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:D854–62. DOI: 10.1093/nar/gkp1004.
14. Ansari H.R., Flower D.R., Raghava G.P.S. AntigenDB: an immunoinformatics database of pathogen antigens. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:D847–53. DOI: 10.1093/nar/gkp830.
15. Xiang Z., Todd T., Ku K.P., Kovacic B.L., Larson C.B., Chen F., Hodges A.P., Tian Y., Olenzek E.A., Zhao B., Colby L.A., Rush H.G., Gilsdorf J.R., Jourdain G.W., He Y. VIOLIN: vaccine investigation and online information network. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36:D923–8. DOI: 10.1093/nar/gkm1039.
16. Petsko G.A., Ringe D. Protein Structure and Function. New Science Press; 2004. 195 p.
17. Doytchinova I.A., Flower D.R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinform.* 2007; 8:4. DOI: 10.1186/1471-2105-8-4.
18. Wold S., Jonsson J., Sjöström M., Sandberg M., Rannar S. DNA and peptide sequences and chemical processes multivariately modeled by principal component analysis and partial least-squares projections to latent structures. *Anal. Chim. Acta*. 1993; 277(2):239–53. DOI: 10.1016/0003-2670(93)80437-P.
19. Сутягин В.В., Ковалёва Г.Г. Белки вакцинного штамма чумного микроба (*Yersinia pestis* EV НИИЭГ) с потенциальными свойствами аллергенов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:97–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-97-101.
20. Брагин А.О., Соколов В.С., Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Брагина Е.Ю., Матушкин Ю.Г., Иванисенко В.А. Программа AllPred для предсказания аллергенности бактерий и архей. *Молекулярная биология*. 2018; 52(2):326–32. DOI: 10.7868/S0026898418020179.
21. De Groot A.S., Shai H., Aubin C.S., McMurphy J., Martin W. Immuno-informatics: Mining genomes for vaccine components. *Immunol. Cell Biol.* 2002; 80(3):255–69. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2002.01092.x.
22. Pizza P., Scarlato V., Masignani V., Giuliani M.M., Arico B., Comanducci M., Jennings G.T., Baldi L., Bartolini E., Capecci B., Galeotti C.L., Luzzi E., Manetti R., Marchetti E., Mora M., Nuti S., Ratti G., Santini L., Savino S., Scarselli M., Storni E., Zuo P., Broecker M., Hundt E., Knapp B., Blair E., Mason T., Tettelin H., Hood D.W., Jeffries A.C., Saunders N.J., Granoff D.M., Venter J.C., Moxon E.R., Grandi G., Rappuoli R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*. 2000; 287:1816–20. DOI: 10.1126/science.287.5459.1816.
23. Ribas-Aparicio R.M., Castelán-Vega J.A., Jiménez-Alberto A., Monterrubio-López G.P., Aparicio-Ozores G. The impact of bio-informatics on vaccine design and development. In: Afrin F., Hemeg H., Ozbak H., editors. *Vaccines*. InTechOpen; 2017. P. 123–45. DOI: 10.5772/intechopen.69273.
24. Cornick J.E., Bishop Ö.T., Yalcin F., Kiran A.M., Kumwenda B., Chagaza C., Govindpershad S., Ousmane S., Senghore M., Plessis M., Pluschke G., Ebruke C., McGee L., Sigauque B., Collard J.-M., Bentley S.D., Kadioglu A., Antonio M., von Gottberg A., French N., Klugman K.P., Heyderman R.S., Alderson M., Everett D.B. The global distribution and diversity of protein vaccine candidate antigens in the highly virulent *Streptococcus pneumoniae* serotype 1. *Vaccine*. 2017; 35(6):972–80. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.12.037.
25. Bosio C.F., Jarrett C.O., Gardner D., Hinnebusch B.J. Kinetics of innate immune response to *Yersinia pestis* after intradermal infection in a mouse model. *Infect. Immun.* 2012; 80(11):4034–45. DOI: 10.1128/IAI.00606-12.
26. Подладчикова 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.
27. Копылов П.Х., Анисимов А.П. Современные требования к чумным вакцинам. *Бактериология*. 2019; 4(4):42–6. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-42-46.
28. Feodorova V.A., Lyapina A.M., Khizhnyakova M.A., Zaitsev S.S., Saltykov Y.V., Motin V.L. *Yersinia pestis* antigen F1 but not LcrV induced humoral and cellular immune responses in humans immunized with live plague vaccine-comparison of immunoinformatic and immunological approaches. *Vaccines*. 2020; 8(4):698. DOI: 10.3390/vaccines8040698.
29. Williamson E.D., Flick-Smith H.C., Waters E., Miller J., Hodgson I., Le Butt C.S., Hill J. Immunogenicity of the rF1+rV vaccine for plague with identification of potential immune correlates. *Microb. Pathog.* 2007; 42(1):11–21. DOI: 10.1016/j.micpath.2006.09.003.
30. Demeure C., Dussurget O., Mas Fiol G., Le Guern A.-S., Savin C., Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination and diagnostics. *Microbes Infect.* 2019; 21(5-6):202–12. DOI: 10.1016/j.micinf.2019.06.007.
31. Cornelius C., Quenee L., Anderson D., Schneewind O. Protective immunity against plague. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 603:415–24. DOI: 10.1007/978-0-387-72124-8_38.
32. Brubaker R.R. Interleukin-10 and the inhibition of innate immunity to *Yersinia*: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect. Immun.* 2003; 71(7):3673–81. DOI: 10.1128/IAI.71.7.3673-3681.2003.
33. Quenee L.E., Schneewind O. Plague vaccines and the molecular basis of immunity against *Yersinia pestis*. *Hum. Vaccin.* 2009; 5(12):817–23. DOI: 10.4161/hv.9866.
34. Overheim K.A., Depaolo R.W., DeBord K.L., Morrill E.M., Anderson D.M., Green N.M., Brubaker R.R., Jabri B., Schneewind O. LcrV plague vaccine with altered immunomodulatory properties. *Infect. Immun.* 2005; 73(8):5152–9. DOI: 10.1128/IAI.73.8.5152-5159.2005.
35. DeBord K.L., Anderson D.M., Marketon M.M., Overheim K.A., Depaolo R.W., Ciletti N.A., Jabri B., Schneewind O. Immunogenicity and protective immunity against bubonic plague and pneumonic plague by immunization of mice with the recombinant V10 antigen, a variant of LcrV. *Infect. Immun.* 2006; 74(8):4910–4. DOI: 10.1128/IAI.01860-05.
36. Daniel C., Dewitte A., Poirat S., Marceau M., Simonet M., Marceau L., Descombes G., Bouteiller D., Bennaceur N., Bontemps-Gallo S., Lemaître N., Sebbane F. Polymorphism in the *Yersinia* LcrV antigen enables immune escape from the protection conferred by an LcrV-secreting *Lactococcus lactis* in a *Pseudotuberculosis* mouse model. *Front. Immunol.* 2019; 10:1830. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01830.
37. Demeure C.E., Dussurget O., Fiol G.M., Le Guern A.S., Savin C., Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Genes Immun.* 2019; 20(5):357–70. DOI: 10.1038/s41435-019-0065-0.
38. Li B., Zhou L., Guo J., Wang X., Ni B., Ke Y., Zhu Z., Guo Z., Yang R. High-throughput identification of new protective antigens from a *Yersinia pestis* live vaccine by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 2009; 77(10):4356–61. DOI: 10.1128/IAI.00242-09.
39. Erova T.E., Rosenzweig J.A., Sha J., Suarez G., Sierra J.C., Kirtley M.L., van Lier C.J., Telepnev M.V., Motin V.L., Chopra A.K. Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(2):227–38. DOI: 10.1128/CVI.00597-12.
40. Lin J.S., Szaba F.M., Kummer L.W., Chromy B.A., Smiley S.T. *Yersinia pestis* YopE contains a dominant CD8 T cell epitope that confers protection in a mouse model of pneumonic plague. *J. Immunol.* 2011; 187(2):897–904. DOI: 10.4049/jimmunol.1100174.

41. Zhang Y., Mena P., Romanov G., Bliska J.B. Effector CD8+ T cells are generated in response to an immunodominant epitope in type III effector YopE during primary *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Infect. Immun.* 2014; 82(7):3033–44. DOI: 10.1128/IAI.01687-14.
 42. Szaba F.M., Kummer L.W., Wilhelm L.B., Lin J.S., Parent M.A., Montminy-Paquette S.W., Lien E., Johnson L.L., Smiley S.T. D27-pLpxL, an avirulent strain of *Yersinia pestis*, primes T cells that protect against pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2009; 77(10):4295–304. DOI: 10.1128/IAI.00273-09.
 43. Szaba F.M., Kummer L.W., Duso D.K., Koroleva E.P., Tumanov A.V., Cooper A.M., Bliska J.B., Smiley S.T., Lin J.S. TNF α and IFN γ but not perforin are critical for CD8 T cell-mediated protection against pulmonary *Yersinia pestis* infection. *PLoS Pathog.* 2014; 10(5):e1004142. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004142.
 44. Zvi A., Rotem S., Zauberman A., Elia U., Aftalion M., Bar-Haim E., Mamroud E., Cohen O. Novel CTL epitopes identified through a *Y. pestis* proteome-wide analysis in the search for vaccine candidates against plague. *Vaccine.* 2017; 35(44):5995–6006. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.092.
 45. Chowell D., Krishna S., Becker P.D., Cocita C., Shu J., Tan X., Greenberg P.D., Klavinskis L.S., Blattman J.N., Anderson K.S. TCR contact residue hydrophobicity is a hallmark of immunogenic CD8+ T cell epitopes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2015; 112(14):E1754–62. DOI: 10.1073/pnas.1500973112.
- ## References
1. Knirel' Yu.A., Fedorova V.A., Anisimov A.P. [Struggling for control over the plague. The past and present of the Black Death]. *Vestnik Rossijskoi Akademii Nauk [Herald of the Russian Academy of Sciences]*. 2011; 81(1):33–42.
 2. Dentovskaya S.V., Kopylov P.Kh., Ivanov S.A., Ageev S.A., Anisimov A.P. [Molecular bases of vaccine-prevention of plague]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2013; (3):3–12.
 3. Cui Y., Yang X., Xiao X., Anisimov A.P., Li D., Yan Y., Zhou D., Rajerison M., Carniel E., Achtman M., Yang R., Song Y. Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (*Yersinia pestis* EV76 lineage) during laboratory passages in different countries. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 26:172–9. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.05.023.
 4. WHO – Plague vaccines workshop April 23 2018 (Cited 20 March 2021) [Internet]. Available from: https://www.who.int/blueprint/what/ norms-standards/Plague_vaccines_workshop-23-april-2018/en/.
 5. Sun W., Singh A.K. Plague vaccine: recent progress and prospects. *Vaccines.* 2019; 4:11. DOI: 10.1038/s41541-019-0105-9.
 6. Semakova A.P., Kudryavtseva O.M., Popova P.Yu., Komissarov A.V., Mikshis N.I. [Stabilization by freeze-drying of *Bacillus anthracis* immunogenic antigens as a component of anthrax recombinant vaccine prototype]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2017; 33(3):57–65. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-57-65.
 7. Krasil'nikova E.A., Trunyakova A.S., Vagaiskaya A.S., Svetoch T.E., Shaikhutdinova R.Z., Dentovskaya S.V. [A search for new molecular targets for optimizing plague preventive vaccination and therapy]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2021; 11(2):265–82. DOI: 10.15789/2220-7619-SNM-1254.
 8. Mikshis N.I., Kuttyev V.V. [Current state of the problem of vaccine development for specific prophylaxis of plague]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (1):50–63. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-50-63.
 9. Flower D.R., Davies M.N., Doytchinova I.A. Identification of candidate vaccine antigens *in silico*. In: Flower D.R., Perrie Y., editors. *Immunomic Discovery of Adjuvants and Candidate Subunit Vaccines*. New York: Springer; 2013. P. 39–71. DOI: 10.1007/978-1-4614-5070-2_3.
 10. Toseland C.P., Clayton D.J., McSparron H., Hemsley S.L., Blythe M.J., Paine K., Doytchinova I.A., Guan P., Hattotuwigama C.K., Flower D.R. AntiJen: a quantitative immunology database integrating functional, thermodynamic, kinetic, biophysical, and cellular data. *Immunome Res.* 2005; 1(1):4. DOI: 10.1186/1745-7580-1-4.
 11. McSparron H., Blythe M.J., Zygori C., Doytchinova I.A., Flower D.R. JenPep: a novel computational information resource for immunobiology and vaccinology. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2003; 43(4):1276–87. DOI: 10.1021/ci030461e.
 12. Blythe M.J., Doytchinova I.A., Flower D.R. JenPep: a database of quantitative functional peptide data for immunology. *Bioinformatics.* 2002; 18(3):434–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/18.3.434.
 13. Vita R., Zarebski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Salimi N., Damle R., Sette A., Peters B. The immune epitope database 2.0. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:D854–62. DOI: 10.1093/nar/gkp1004.
 14. Ansari H.R., Flower D.R., Raghava G.P.S. AntigenDB: an immunoinformatics database of pathogen antigens. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:D847–53. DOI: 10.1093/nar/gkp830.
 15. Xiang Z., Todd T., Ku K.P., Kovacic B.L., Larson C.B., Chen F., Hodges A.P., Tian Y., Olenzek E.A., Zhao B., Colby L.A., Rush H.G., Gilsdorf J.R., Jourdain G.W., He Y. VIOLIN: vaccine investigation and online information network. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36:D923–8. DOI: 10.1093/nar/gkm1039.
 16. Petsko G.A., Ringe D. Protein Structure and Function. New Science Press; 2004. 195 p.
 17. Doytchinova I.A., Flower D.R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinform.* 2007; 8:4. DOI: 10.1186/1471-2105-8-4.
 18. Wold S., Jonsson J., Sjöström M., Sandberg M., Rännar S. DNA and peptide sequences and chemical processes multivariately modeled by principal component analysis and partial least-squares projections to latent structures. *Anal. Chim. Acta.* 1993; 277(2):239–53. DOI: 10.1016/0003-2670(93)80437-P.
 19. Sutyagin V.V., Kovaleva G.G. [Proteins of the plague microbe vaccine strain (*Yersinia pestis* EV NIEG) with potential allergen properties]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (4):97–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-97-101.
 20. Bragin A.O., Sokolov V.S., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Bragina E.Yu., Matushkin Yu.G., Ivanisenko V.A. [Prediction of bacterial and archaeal allergenicity with AllPred program]. *Molekulyarnaya Biologiya [Molecular Biology]*. 2018; 52(2):326–32. DOI: 10.7868/S0026898418020179.
 21. De Groot A.S., Sbaji H., Aubin C.S., McMurry J., Martin W. Immuno-informatics: Mining genomes for vaccine components. *Immunol. Cell Biol.* 2002; 80(3):255–69. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2002.01092.x.
 22. Pizzi M., Scarlato V., Masignani V., Giuliani M.M., Aricò B., Comanducci M., Jennings G.T., Baldi L., Bartolini E., Capecci B., Galeotti C.L., Luzzi E., Manetti R., Marchetti E., Mora M., Nuti S., Ratti G., Santini L., Savino S., Scarselli M., Storni E., Zuo P., Broecker M., Hundt E., Knapp B., Blair E., Mason T., Tettelin H., Hood D.W., Jeffries A.C., Saunders N.J., Granoff D.M., Venter J.C., Moxon E.R., Grandi G., Rappuoli R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science.* 2000; 287:1816–20. DOI: 10.1126/science.287.5459.1816.
 23. Ribas-Aparicio R.M., Castelán-Vega J.A., Jiménez-Alberto A., Monterrubio-López G.P., Aparicio-Ozores G. The impact of bio-informatics on vaccine design and development. In: Afrin F., Hemeg H., Ozbak H., editors. *Vaccines*. InTechOpen; 2017. P. 123–45. DOI: 10.5772/intechopen.69273.
 24. Cornick J.E., Bishop Ö.T., Yalcin F., Kiran A.M., Kumwenda B., Chaguzha C., Govindpersad S., Ousmane S., Senghore M., Plessis M., Pluschke G., Ebruke C., McGee L., Sigauque B., Collard J.-M., Bentley S.D., Kadioglu A., Antonio M., von Gottberg A., French N., Klugman K.P., Heyderman R.S., Alderson M., Everett D.B. The global distribution and diversity of protein vaccine candidate antigens in the highly virulent *Streptococcus pneumoniae* serotype 1. *Vaccine.* 2017; 35(6):972–80. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.12.037.
 25. Bosio C.F., Jarrett C.O., Gardner D., Hinnebusch B.J. Kinetics of innate immune response to *Yersinia pestis* after intradermal infection in a mouse model. *Infect. Immun.* 2012; 80(11):4034–45. DOI: 10.1128/IAI.00606-12.
 26. Podladchikova O.N. [Modern views on molecular mechanisms of plague pathogenesis]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (3):33–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40.
 27. Kopylov P.Kh., Anisimov A.P. [Modern requirements for plague vaccines]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2019; 4(4):42–6. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-46-46.
 28. Feodorova V.A., Lyapina A.M., Khizhnyakova M.A., Zaitsev S.S., Saltykov Y.V., Motin V.L. *Yersinia pestis* antigen F1 but not LcrV induced humoral and cellular immune responses in humans immunized with live plague vaccine-comparison of immunoinformatic and immunological approaches. *Vaccines.* 2020; 8(4):698. DOI: 10.3390/vaccines8040698.
 29. Williamson E.D., Flick-Smith H.C., Waters E., Miller J., Hodgson I., Le Butt C.S., Hill J. Immunogenicity of the rF1+rV vaccine for plague with identification of potential immune correlates. *Microb. Pathog.* 2007; 42(1):11–21. DOI: 10.1016/j.micpath.2006.09.003.
 30. Demeure C., Dussurget O., Mas Fiol G., Le Guern A.-S., Savin C., Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination and diagnostics. *Microbes Infect.* 2019; 21(5-6):202–12. DOI: 10.1016/j.micinf.2019.06.007.
 31. Cornelius C., Quence L., Anderson D., Schneewind O. Protective immunity against plague. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 603:415–24. DOI: 10.1007/978-0-387-72124-8_38.
 32. Brubaker R.R. Interleukin-10 and the inhibition of innate immunity to *Yersinia*: roles of Yops and LcrV (V antigen).

Infect. Immun. 2003; 71(7):3673–81. DOI: 10.1128/IAI.71.7.3673-3681.2003.

33. Quenee L.E., Schneewind O. Plague vaccines and the molecular basis of immunity against *Yersinia pestis*. *Hum. Vaccin.* 2009; 5(12):817–23. DOI: 10.4161/hv.9866.

34. Overheim K.A., Depaolo R.W., Debord K.L., Morrin E.M., Anderson D.M., Green N.M., Brubaker R.R., Jabri B., Schneewind O. LcrV plague vaccine with altered immunomodulatory properties. *Infect. Immun.* 2005; 73(8):5152–9. DOI: 10.1128/IAI.73.8.5152-5159.2005.

35. DeBord K.L., Anderson D.M., Marketon M.M., Overheim K.A., DePaolo R.W., Ciletti N.A., Jabri B., Schneewind O. Immunogenicity and protective immunity against bubonic plague and pneumonic plague by immunization of mice with the recombinant V10 antigen, a variant of LcrV. *Infect. Immun.* 2006; 74(8):4910–4. DOI: 10.1128/IAI.01860-05.

36. Daniel C., Dewitte A., Poirot S., Marceau M., Simonet M., Marceau L., Descombes G., Boutillier D., Bennaceur N., Bontemps-Gallo S., Lemaître N., Sebbane F. Polymorphism in the *Yersinia* LcrV antigen enables immune escape from the protection conferred by an LcrV-secreting *Lactococcus lactis* in a *Pseudotuberculosis* mouse model. *Front. Immunol.* 2019; 10:1830. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01830.

37. Demeure C.E., Dussurget O., Fiol G.M., Le Guern A.S., Savin C., Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Genes Immun.* 2019; 20(5):357–70. DOI: 10.1038/s41435-019-0065-0.

38. Li B., Zhou L., Guo J., Wang X., Ni B., Ke Y., Zhu Z., Guo Z., Yang R. High-throughput identification of new protective antigens from a *Yersinia pestis* live vaccine by enzyme-linked immunospot assay. *Infect. Immun.* 2009; 77(10): 4356–61. DOI: 10.1128/IAI.00242-09.

39. Erova T.E., Rosenzweig J.A., Sha J., Suarez G., Sierra J.C., Kirtley M.L., van Lier C.J., Telepnev M.V., Motin V.L., Chopra A.K. Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(2):227–38. DOI: 10.1128/CVI.00597-12.

40. Lin J.S., Szaba F.M., Kummer L.W., Chromy B.A., Smiley S.T. *Yersinia pestis* YopE contains a dominant CD8 T cell epitope that con-

fers protection in a mouse model of pneumonic plague. *J. Immunol.* 2011; 187(2):897–904. DOI: 10.4049/jimmunol.1100174.

41. Zhang Y., Mena P., Romanov G., Bliska J.B. Effector CD8+ T cells are generated in response to an immunodominant epitope in type III effector YopE during primary *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Infect. Immun.* 2014; 82(7):3033–44. DOI: 10.1128/IAI.01687-14.

42. Szaba F.M., Kummer L.W., Wilhelm L.B., Lin J.S., Parent M.A., Montminy-Paquette S.W., Lien E., Johnson L.L., Smiley S.T. D27-pLpxL, an avirulent strain of *Yersinia pestis*, primes T cells that protect against pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2009; 77(10):4295–304. DOI: 10.1128/IAI.00273-09.

43. Szaba F.M., Kummer L.W., Duso D.K., Koroleva E.P., Tumanov A.V., Cooper A.M., Bliska J.B., Smiley S.T., Lin J.S. TNFα and IFNγ but not perforin are critical for CD8 T cell-mediated protection against pulmonary *Yersinia pestis* infection. *PLoS Pathog.* 2014; 10(5):e1004142. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004142.

44. Zvi A., Rotem S., Zauberman A., Elia U., Aftalion M., Bar-Haim E., Mamroud E., Cohen O. Novel CTL epitopes identified through a *Y. pestis* proteome-wide analysis in the search for vaccine candidates against plague. *Vaccine.* 2017; 35(44):5995–6006. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.092.

45. Chowell D., Krishna S., Becker P.D., Cocita C., Shu J., Tan X., Greenberg P.D., Klavinskis L.S., Blattman J.N., Anderson K.S. TCR contact residue hydrophobicity is a hallmark of immunogenic CD8+ T cell epitopes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2015; 112(14):E1754–62. DOI: 10.1073/pnas.1500973112.

Authors:

Budanova A.A., Shchukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Буданова А.А., Щуковская Т.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-14-22

УДК 616.98:579.2

Д.А. Кузнецова, В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова

Сидерофоры бактерий: структура, функции и роль в патогенезе инфекций*ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация*

В обзоре систематизированы и проанализированы опубликованные за последние десять лет работы, посвященные изучению низкомолекулярных высокоаффинных хелаторов железа – сидерофоров. Сидерофоры, которые обнаружены у бактерий, грибов и млекопитающих, способны извлекать железо из нерастворимых неорганических соединений, а в организме хозяина – из комплексов с белками, выполняющими функцию неспецифической защиты млекопитающих от инфекций. Извлеченное железо сидерофоры доставляют клеткам с помощью специфичных для каждого сидерофора поверхностных белковых рецепторов, а также различных белковых транспортных систем, входящих в состав мембран. У патогенных бактерий сидерофоры играют важную роль в вирулентности, выполняя множество функций в организме хозяина, помимо обеспечения микробов железом и другими биологическими металлами. Они участвуют в хранении токсичного для клеток избытка железа, защищают бактерии от реактивных соединений кислорода, конкурируют за железо с фагоцитами, оказывают токсическое действие на клетки хозяина, в некоторых случаях играя роль секретируемого бактериального токсина. Сидерофоры бактерий выполняют сигнальную функцию и регулируют как свой собственный синтез, так и синтез других факторов вирулентности. Многие патогенные бактерии продуцируют несколько сидерофоров, активных в разных условиях, в отношении разных источников железа в организме хозяина и на разных этапах инфекционного процесса. Приведены данные экспериментальных исследований, направленных на выяснение структуры и многообразных функций бактериальных сидерофоров, механизмов их биосинтеза и регуляции экспрессии, а также роли этих молекул в физиологии и вирулентности патогенных бактерий. Особое внимание уделено сидерофорам бактерий, вызывающих особо опасные инфекции.

Ключевые слова: сидерофоры, железо, вирулентность, патогенез.

Корреспондирующий автор: Кузнецова Дарья Александровна, e-mail: dariakuz3112@bk.ru.

Для цитирования: Кузнецова Д.А., Рыкова В.А., Подладчикова О.Н. Сидерофоры бактерий: структура, функции и роль в патогенезе инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; 3:14–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-14-22

Поступила 22.12.2021. Принята к публ. 03.03.2022.

D.A. Kuznetsova, V.A. Rykova, O.N. Podladchikova**Bacterial Siderophores: Structure, Functions, and Role in the Pathogenesis of Infections***Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation*

Abstract. This review systematizes and analyzes the data published over the past decade, devoted to the study of low-molecular-weight high affinity iron chelators – siderophores. Siderophores, which are found in bacteria, fungi and mammals, are able to extract iron from insoluble inorganic compounds, and in the host organism – from complexes with proteins that perform the function of nonspecific protection of mammals from infections. The extracted iron is delivered to cells through surface protein receptors specific for each siderophore, as well as various protein transport systems that make up membranes. Siderophores play an important role in virulence in pathogenic bacteria, performing many functions in the host organism, in addition to providing microbes with iron and other biological metals. They participate in the storage of excess iron, toxic to cells, protect bacteria from reactive oxygen compounds, compete for iron with phagocytes, and have a harmful effect on host cells, acting as secreted bacterial toxin in some cases. Bacterial siderophores perform a signaling function and regulate both, their own synthesis and the synthesis of other virulence factors. Many pathogenic bacteria produce several siderophores that are active under different conditions, against various sources of iron in the host organism and at different stages of infectious process. The review presents the results of the experimental studies aimed at elucidating the structure and diverse functions of bacterial siderophores, the mechanisms of their biosynthesis and regulation of expression, as well as the role of these molecules in the physiology and virulence of pathogenic bacteria. Special emphasis is put on siderophores of bacteria causing particularly dangerous infections.

Key words: siderophores, iron, virulence, pathogenesis.

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

Corresponding author: Daria A. Kuznetsova, e-mail: dariakuz3112@bk.ru.

Citation: Kuznetsova D.A., Rykova V.A., Podladchikova O.N. Bacterial Siderophores: Structure, Functions, and Role in the Pathogenesis of Infections. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:14–22. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-14-22

Received 22.12.2021. Accepted 03.03.2022.

Kuznetsova D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4198-0629>
Rykova V.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3484-5100>

Podladchikova O.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7178-2255>

Среди всех микроэлементов, способных влиять на исход взаимодействия патогенных бактерий с организмом хозяина, железо стоит на первом ме-

сте [1]. Оно является существенным питательным элементом и необходимым компонентом для роста, деления и функционирования клеток. В растворах

железо существует в двух формах окисления: Fe^{3+} и Fe^{2+} , которые различаются по химическим свойствам и способности связываться с различными лигандами. Благодаря способности быть донором и акцептором электронов, железо участвует в различных окислительно-восстановительных реакциях. Оно входит в состав цитохромов, каталаз, ферментов цикла трикарбоновых кислот и необходимо бактериям для деления, генерации энергии и работы ряда ферментов. Только у лактобацилл описано отсутствие потребности в железе, что объясняет их способность расти в молоке – строго железодефицитной среде из-за присутствия лактоферрина. Гены железосодержащих белков также не были обнаружены у *Borrelia burgdorferi* и *Treponema pallidum*, но эти бактерии, имеющие редуцированные геномы, являются облигатными внутриклеточными патогенами и могут использовать железорзависимые системы хозяина для генерации энергии и биосинтеза.

Большинство патогенных бактерий для ассимиляции железа используют сидерофоры – разнообразные по структуре низкомолекулярные органические соединения, которые представляют собой высокоаффинные хелаторы железа, извлекающие металл из его комплексов с белками и доставляющие его клеткам с помощью специфических для каждого сидерофора белковых рецепторов. Со времени обнаружения первых сидерофоров в 1950-х гг. охарактеризовано более 500 разных сидерофоров, выделенных из бактерий и грибов. Получено огромное количество данных о структуре, путях метаболизма и разнообразии их роли в физиологии микроорганизмов [2]. Многочисленные исследования этих молекул у патогенных бактерий показали, что они являются важными факторами вирулентности, которые выполняют множество функций в организме хозяина, помимо обеспечения микробов железом и другими биологическими металлами [3]. Понимание важности сидерофоров для патогенеза инфекционных заболеваний сделало их одним из наиболее изучаемых объектов в микробиологии [4–6]. В Московском государственном университете ведутся исследования механизмов транспорта цианобактериями ксеносидерофоров, которые продуцируются другими бактериями и являются единственным источником железа, необходимого для их роста [7].

Цель настоящего обзора заключается в обобщении результатов исследования бактериальных сидерофоров, которые были получены главным образом за последние десять лет. Особое внимание в обзоре уделяется сидерофорам патогенных бактерий, в частности возбудителей особо опасных инфекций (ООИ).

Борьба за железо – поле битвы патогенных бактерий с организмом хозяина. Процессы ассимиляции железа особенно существенны для патогенных бактерий, поскольку в организме хозяина железо прочно связано с белками, выполняющими функцию неспецифической защиты млекопитающих

от инфекций [8, 9]. Продукция этих белков повышается при инфекции, что способствует еще большему снижению концентрации свободного железа. Такой механизм врожденного иммунитета млекопитающих получил название «пищевой иммунитет» [10]. Этот процесс обусловлен множеством факторов: снижением ассимиляции железа из пищи; супрессией эффлюкса железа из макрофагов, поглотивших поврежденные эритроциты; повышением синтеза ферритина; выходом из костного мозга в циркуляцию нейтрофилов и секрецией ими аполактоферрина, связывающего железо в местах инфекции; поглощением связанного с лактоферрином железа макрофагами; секрецией клетками печени гаптоглобина и гемопексина, связывающих гемоглобин и гем; синтезом макрофагами оксида азота, нарушающего метаболизм железа бактериями; снижением количества рецепторов трансферрина на поверхности макрофагов для торможения роста внутриклеточных патогенов.

Гомеостаз железа в организме млекопитающих подвержен тонкой регуляции, контролирующей вне- и внутриклеточную концентрацию металла [11]. В этом процессе участвует множество факторов, регулирующих поступление, использование и хранение железа. Железо попадает в организм животных путем всасывания из пищи в двенадцатиперстной кишке, но главным образом за счет разрушения гемоглобина старых эритроцитов в макрофагах. Избыток железа хранится в нерастворимой форме в комплексе с белком ферритином [12] в макрофагах и клетках печени. При потребности в железе оно транспортируется клеткам из этих резервуаров. Из макрофагов и дуоденальных энтероцитов ферропортин транспортирует железо в плазму, где оно комплексируется трансферрином и доставляется клеткам после интернализации комплекса рецептором трансферрина первого типа TfR1. Количество ферропортина регулируется с помощью секретируемого гепатоцитами пептидного гормона гепцидина, который способствует деградации ферропортина и снижению эффлюкса железа в циркуляцию. При потребности в железе экспрессия гепцидина снижается, а в ответ на повышение концентрации железа – повышается. Увеличение экспрессии гепцидина наблюдается и при воспалении, когда провоспалительные цитокины (IL-6, TNF α и IL-1) являются сигналом к его синтезу. Уровень свободного железа внутри клеток зависит от его количества в циркуляции и контролируется экспрессией TfR1 на поверхности клеток и цитоплазматического белка хранения железа – ферритина. Отклонение концентрации железа от нормы является для организма животных сигналом опасности и способствует активации провоспалительных и антимикробных механизмов.

На первых минутах после повреждения тканей или внедрения микробов в организм млекопитающего начинают работать системы врожденного иммунитета, включающие комплекс противомикробных механизмов [10]. Первым из таких механизмов яв-

ляется удаление железа от патогенов, поскольку оно напрямую влияет на рост и вирулентность микробов. Привлеченные к месту инфекции нейтрофилы секретируют лактоферрин, который гораздо прочнее связывает железо, чем сывороточный белок трансферрин, и препятствует агрегации бактерий и образованию биопленок. Бактериальные инфекции способствуют увеличению синтеза гепцидина в гепатоцитах, который при попадании в кровь блокирует всасывание железа в кишечнике и освобождение железа из ферритина. Ключевым фактором в этом процессе является ферропортин. Увеличенная экспрессия ферропортина на поверхности макрофагов, которая приводит к снижению концентрации внутриклеточного железа, тормозит рост ряда внутриклеточных патогенов.

Избыток железа в организме хозяина способствует развитию многих инфекционных заболеваний. Наличие свободного железа, с одной стороны, облегчает бактериям его ассимиляцию и содействует размножению микробов, а с другой стороны, способствует образованию гидроксил-радикалов, которые разрушают биополимеры. Гиперферремия наблюдается при таких наследственных заболеваниях, как талассемия и гемохроматоз. Такие больные имеют повышенную чувствительность к инфекции даже аттеннуированными штаммами бактерий. Более того, избыток свободного железа повышает вирулентность патогенных бактерий [13].

Для патогенных бактерий успешная колонизация хозяина и способность вызывать заболевание в значительной мере зависят от их возможности ассимилировать железо [14]. Недостаток железа воспринимается бактериями как сигнал присутствия в организме хозяина и необходимости перестроить свой метаболизм таким образом, чтобы успешно конкурировать с хозяином за железо. Контроль гомеостаза железа является центральным полем битвы между хозяином и патогеном и непосредственно влияет на течение и исход инфекционного заболевания [15].

Ассимиляция железа патогенными бактериями в организме хозяина. Для ассимиляции железа в организме хозяина патогенные бактерии используют ряд механизмов [16], позволяющих им успешно конкурировать с хозяином и выживать в его разных органах, в которых ионы железа связаны с различными лигандами. На первых этапах инфекции бактерии могут использовать собственные запасы железа, которые присутствуют внутри клеток в комплексе с белками хранения (ферритин, бактериоферритин и белки Dps). Доступность железа для бактерий может быть достигнута в присутствии различных органических соединений, которые способны связывать Fe^{3+} . Так, бактерии секретируют продукт метаболизма цитрат, который является слабым хелатором железа, но может доставлять его бактериям. Некоторые бактерии имеют на своей поверхности рецепторы железосвязывающих белков (трансферрин, лактоферрин) или гемсодержащих белков либо секрети-

руют белки-гемофоры, способные извлекать гем из гемсвязывающих белков. При этом многие бактерии для получения доступа к гемоглобину используют гемолизины, специфичные для отдельных видов животных. Еще одной стратегией ассимиляции железа является использование поверхностных ферриредуктаз [17] для восстановления и диссоциации трехвалентного железа из его комплексов с белками. В результате восстановления более растворимое двухвалентное железо может поглощаться бактериями с помощью специальных транспортных систем.

Однако большинство бактерий в железодефицитных условиях хозяина использует высокоаффинные системы транспорта железа, связанные с секрецией в среду низкомолекулярных хелаторов железа – сидерофоров, извлекающих металл из его комплексов с белками и доставляющих его внутрь клеток [18, 19]. Процесс ассимиляции железа с помощью сидерофоров патогенными грамотрицательными бактериями в организме хозяина происходит следующим образом [16]. Сидерофоры секретируются бактериями во внешнюю среду, извлекают железо из его комплексов с белками, диффундируют к поверхности бактерий, связываются со специфическими рецепторами наружной мембраны и транспортируются в периплазму, используя в качестве источника энергии комплекс белка TonB. В периплазме ферри-сидерофоры взаимодействуют с соответствующим связывающим белком (periplasmic binding protein, PBP), который доставляет их к ABC-транспортеру (ATP-binding cassette) внутренней мембраны для транспорта в цитоплазму.

Сидерофоры обнаружены практически у всех патогенных и условно патогенных бактерий, у которых их пытались искать. Очевидно, что необходимость синтезировать сидерофоры отсутствует у патогенов, размножающихся внутри хозяйских клеток, где источником железа для них могут служить ферритин, гем или свободное железо, освобождаемое из трансферрина при pH 5,5–6,0 [20]. Так, мутанты *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, у которых инактивированы гены биосинтеза сидерофоров, не растут внеклеточно, но размножаются внутри хозяйских клеток. Некоторые виды бактерий не продуцируют собственных сидерофоров, но вместо этого используют сидерофоры, продуцируемые другими бактериями (так называемые ксеносидерофоры). Этот феномен, получивший название «сидерофорное пиратство», распространен среди патогенных бактерий, в том числе и тех, которые способны синтезировать собственные сидерофоры, но в определенных условиях используют сидерофоры, продуцируемые комменсалами или бактериями, транзиторно пребывающими с патогеном в одной экологической нише [21]. Для поглощения ксеносидерофоров бактерии экспрессируют на своей поверхности специализированные рецепторы и синтезируют белки, участвующие в транспорте нагруженных железом сидерофоров через мембраны в цитоплазму.

Структура и биосинтез сидерофоров. Сидерофоры являются небольшими молекулами пептидной природы, образованными в том числе аминокислотами, не входящими в состав белков, а также модифицированными аминокислотами [18, 19]. Кроме того, в состав разных сидерофоров могут включаться жирные кислоты, α -кетокислоты и α -гидроксикислоты. Сидерофоры, выделенные из разных бактерий, значительно отличаются по структуре и содержат разные функциональные группы, которые обеспечивают высокоаффинное связывание трехвалентного железа. Существует четыре типа функциональных групп для координационного связывания железа. Первая группа (фенолятные или катехолятные сидерофоры) включает две прилегающие гидроксильные группы, происходящие из 2,3-гидроксibenзойной кислоты, или гидроксильную группу 2-гидроксibenзойной (салициловой) кислоты. Вторая группа (гидроксаматные сидерофоры) включает N-гидроксильрованные боковые цепи аминокислот, в которых атом кислорода является лигандом железа. Гидроксаматные сидерофоры синтезируются из сукцината и моногидроксильрованных диаминов (например, N-гидроксикадаверин или N-гидроксипутресцин). Третья группа состоит из пятичленных тиазолиновых или оксазолиновых гетероциклов, которые образуются в результате ферментативной циклизации боковых цепей цистеина, серина или треонина. Четвертая группа представлена карбоксилатными и гидроксикарбоксилатными сидерофорами. Наиболее простым представителем этой группы является лимонная кислота. Но есть более сложные молекулы, происходящие из α -кетоглутарата и лимонной кислоты. Довольно часто встречаются сидерофоры, в которых могут присутствовать различные комбинации четырех типов хелатирующих железо групп, что обеспечивает разнообразие структур разных сидерофоров.

Изучение генетических детерминантов сидерофоров показало, что в их биосинтезе, транспорте и регуляции участвуют специализированные ферментные системы. Процесс биосинтеза фенолятных и катехолятных сидерофоров осуществляется с помощью нерибосомных пептид-синтетаз (NRPS) и поликетид-синтетаз (PKS), которые первоначально были охарактеризованы как ферменты, отвечающие за биосинтез антибиотиков. NRPS синтезируют пептиды без участия РНК-матрицы и являются многомодульными ферментами, в которых порядок расположения модулей определяет последовательность активации аминокислот и включения их в синтезирующуюся молекулу [22]. Начальным этапом синтеза является превращение хориэмовой кислоты (предшественник в синтезе ароматических аминокислот, фолиевой кислоты и хинонов) в салициловую или дигидроксibenзойную кислоту. Эти арильные кислоты затем акцептируются многомодульными ферментами (NRPS, PKS), которые последовательно осуществляют синтез сидерофора. Несмотря на сходство структур NRPS

у различных бактерий, структура синтезируемых ими сидерофоров может значительно различаться. При этом важнейшая роль в эволюции сидерофоров принадлежит модульной организации NRPS и способности заменять отдельные модули, а также приобретать дополнительные модифицирующие ферменты путем генетического обмена между бактериями. При этом создаются новые комбинации модулей и ферментов, что обеспечивает синтез разных сидерофоров. С помощью NRPS образуются такие сидерофоры, как иерсиниабактин, энтеробактин, вибриобактин.

Синтез гидроксаматных и карбоксилатных сидерофоров осуществляется рядом ферментов, таких как монооксигеназы, декарбоксилазы, аминотрансферазы, альдолазы. Исследования этого биосинтетического пути, получившего название NRPS-независимого синтеза (NRPS-independent synthesis – NIS), гораздо менее многочисленны и обобщены в недавнем обзоре [23]. В настоящее время изучаются субстратная специфичность и молекулярные механизмы действия ферментов, участвующих в NIS-пути биосинтеза сидерофоров. Разнообразные сочетания генов, кодирующих эти ферменты у разных бактерий, приводят к продукции различающихся по структуре сидерофоров.

Синтезированные бактериями сидерофоры выделяются в среду с помощью специализированных механизмов. Транспорт сидерофоров из цитоплазмы в периплазму осуществляется через белок-посредник MFS (Major Facilitator Subtype). А через наружную мембрану сидерофоры транспортируют белок TolC и связанный с ним белок эффлюксного насоса RND (Resistance-Nodulated-Cell Division). У сидерофоров выявляются и альтернативные способы секреции. Так, обнаружено, что в секреции сидерофора пиовердина псевдомонад принимает участие система секреции VI типа, которая широко используется грамотрицательными бактериями для контакт-зависимой инъекции белковых токсинов в клетки бактерий и эукариотов [24]. Не исключено, что связь пиовердина с системой секреции VI типа может лежать в основе его токсического действия на клетки хозяина [25].

Регуляция экспрессии сидерофоров. В аэробных условиях реактивность железа обуславливает и его потенциальную токсичность, поскольку в присутствии кислорода Fe^{2+} в реакции Фентона и Fe^{3+} в реакции Хабер – Вайса могут генерировать токсичные радикалы [26]. Такие радикалы вызывают денатурацию белков, деполимеризацию полисахаридов, разрывы ДНК, перекисное окисление липидов. Следовательно, как дефицит железа, так и его избыток ведут к крайне неблагоприятным для микроба последствиям. Поэтому процесс поглощения, использования и хранения избытка железа строго регулируется бактериями в ответ на доступность и метаболическую потребность в железе.

Тонкой регуляции подвержены и процессы биосинтеза и транспорта сидерофоров. Известно, что

синтез сидерофоров активируется при снижении концентрации внутриклеточного железа. Наиболее изученным фактором, участвующим в этом процессе, практически у всех бактерий является универсальный белок-репрессор Fur (Ferric uptake regulator) [27]. После образования комплекса с двухвалентным железом Fur связывается с консервативными участками в промоторах генов биосинтеза и транспорта сидерофоров, что приводит к блокировке транскрипции этих генов. В то же время Fur активирует экспрессию генов, участвующих в утилизации и запасании железа. При снижении концентрации внутриклеточного железа Fur утрачивает свою репрессорную функцию, что способствует транскрипции генов синтеза и транспорта сидерофоров.

Наименее изученным является механизм влияния концентрации внеклеточного железа на продукцию сидерофоров. Известно, что этот сигнал могут передавать трансмембранные двухкомпонентные регуляторные системы. Так, у *Salmonella enterica* концентрацию внеклеточного железа чувствует система PmrA-PmrB, которая включает гены, ответственные за модификацию ЛПС и резистентность к полимиксину В и дефензинам. Внеклеточные сигма-факторы, гены которых часто располагаются рядом с кластерами биосинтеза сидерофоров, также могут передавать сигнал о концентрации железа в среде. При этом они осуществляют позитивную регуляцию генов, участвующих в биосинтезе сидерофоров. Сигналы внешней среды, связанные с концентрацией железа и других металлов, способны детектировать и передавать внутрь бактерий и сами сидерофоры [28]. Они часто осуществляют позитивную регуляцию генов биосинтеза сидерофоров в условиях дефицита железа. Основным механизмом является связывание поглощенных клеткой ферри-сидерофоров с соответствующими активаторами, включающими транскрипцию генов биосинтеза данного сидерофора. Это явление, которое позволяет бактерии чувствовать, какой лиганд может быть использован в данной среде, предложено называть «чувство ферримона» [29]. Таким образом, сидерофоры могут выполнять не только функцию ассимиляции железа, но и сенсорную функцию.

Регуляцию продукции сидерофоров может осуществлять система кворум-сенсинга QS (Quorum Sensing). В ответ на увеличение популяции бактерии продуцируют небольшие сигнальные молекулы, такие как ацил-гомосерин-лактон, которые связываются со специфическими рецепторами, передающими сигнал на ДНК [30]. У ряда бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Burkholderia cepacia*) система QS влияет на продукцию сидерофоров. В процессе QS микроорганизмы синтезируют и обнаруживают внеклеточные сигнальные молекулы, концентрация которых является показателем размера популяции. Накопление молекул QS подавляет синтез сидерофоров, что приводит к сни-

жению их продукции при высокой плотности клеток. Увеличение количества сидерофоров в ответ на повышение синтеза молекул QS зафиксировано у *P. aeruginosa*. Тем не менее до сих пор не до конца понятно, почему сигналы QS подавляют продукцию сидерофоров у одних бактерий, но стимулируют ее у других. Сидерофоры, синтез которых подавляется QS, наиболее вероятно используются в поглощении железа для роста, тогда как те, синтез которых стимулируется, могут служить другим целям. Например, действовать как сигнальные молекулы или факторы вирулентности.

Влияние сидерофоров на вирулентность бактерий. Для целого ряда бактериальных сидерофоров экспериментально доказана их важная роль в вирулентности патогенных и условно патогенных бактерий [6, 19, 31, 32]. Прежде всего это связывали с ролью сидерофоров в ассимиляции бактериями железа в организме хозяина. Однако за последние годы получено огромное количество данных о том, что в процессе инфицирования организма хозяина сидерофоры выполняют множество других функций, помимо обеспечения бактерий железом [3, 19]. Сидерофоры участвуют в хранении токсичного для бактерий избытка железа и ассимиляции других биологических металлов (Cu, Zn), а также в нейтрализации токсического действия тяжелых металлов, таких как Al, Cd, Ga, In, Pb [28]. Благодаря способности сидерофоров связывать другие металлы, кроме железа, в научной литературе их все чаще обозначают как металлофоры.

У многих сидерофоров обнаружена антиоксидантная активность. Особенно выражена она у энтеробактерий, синтезирующих катехолатные сидерофоры, типа энтеробактина [33], но и гидроксаматные сидерофоры также обладают подобными свойствами [34]. Сидерофоры могут выполнять сигнальную и регуляторную функцию, стимулируя как свой собственный синтез [29], так и синтез других факторов вирулентности. Так, сидерофор пиовердин *P. aeruginosa* стимулирует продукцию двух факторов вирулентности: экзотоксина А и протеазы PrtP [35]. Сидерофоры оказывают значительное влияние на образование биопленок, что было доказано как на модели редуцированного генома *Escherichia coli* [36], так и на мутантах *P. aeruginosa*, не продуцирующих сидерофор пиовердин. В свою очередь, образование биопленок, особенно на ранних этапах, стимулирует биосинтез пиовердина [37], а продукция сидерофора способствует созреванию биопленки. Более того, как показали исследования на модели *Bacillus subtilis*, матрикс созревшей биопленки способствует более эффективному использованию сидерофоров бактериями [38].

В организме хозяина сидерофоры могут обладать антибактериальной активностью и подавлять рост резидентной микрофлоры, способствовать выживанию бактерий в сыворотке крови, препятствовать ассимиляции фагоцитами железа, необходимого

для реализации их бактерицидного действия, стимулировать продукцию провоспалительных цитокинов, оказывать токсическое действие на ткани хозяина [39]. Исследования сидерофора пиовердина псевдомонад выявили его способность служить секретуемым бактериальным токсином, вызывающим повреждение митохондрий клеток хозяина [25].

Как показали недавние исследования, сидерофоры могут оказывать не только негативное влияние на хозяина, способствуя размножению патогенов, но и приносить ему пользу. Так, у энтеробактерина обнаружена необычная роль [40]. Оказалось, что этот сидерофор после связывания с α -субъединицей АТФ-синтетазы способствует поглощению железа организмом хозяина. Эти исследования позволяют предположить, что позитивная роль резидентной микрофлоры может быть связана в том числе и с участием ее сидерофоров в гомеостазе железа хозяина.

Множественные сидерофорные системы у бактерий. Наличие у бактерий разных генов биосинтеза сидерофоров, которые часто входят в состав мобильных генетических элементов и способны к горизонтальному переносу, а также накопление в генах мутаций приводят к продукции одним и тем же видом бактерий разных сидерофоров, различающихся по структуре и свойствам [41]. Продукция нескольких сидерофоров может давать бактериям преимущества для выживания в разных условиях. В одних условиях это могут быть высокоаффинные катехолатные сидерофоры (энтеробактин, бациллобактин, вибриобактин). В других условиях наиболее оптимальными будут тиазолин-оксазолин-содержащие молекулы (иерсиниабактин, пиохелин) или гидроксаматные хелаторы (алкалагин, десферриоксамин В). У этих сидерофоров есть очевидные преимущества, которые способствуют их использованию в организме хозяина. Так, в сыворотке крови млекопитающих и секретах нейтрофилов содержится сидерокалин (липокалин-2), который необратимо связывает сидерофоры катехолатного типа, содержащие остаток 2,3-дигидроксibenзойной кислоты (энтеробактин, бациллобактин, карбоксимикобактины), что препятствует поглощению железа бактериями с помощью этих сидерофоров [42]. В отличие от катехолатных сидерофоров, гидроксаматные сидерофоры не связываются с сидерокалином. У ряда патогенных бактерий есть и другой способ избежать узнавания сидерофора сидерокалином, связанный с синтезом модифицированного энтеробактерина (сальмохелина), к которому ковалентно пришта глюкоза. Эта модификация не снижает аффинитет сидерофора к железу, однако препятствует его связыванию с сидерокалином.

Многие патогенные бактерии продуцируют несколько сидерофоров, активных в разных условиях, в отношении разных источников железа в организме хозяина и на разных этапах инфекционного процесса [3]. *P. aeruginosa* продуцирует два сидерофора: сидерофор смешанного типа – пиовердин, необходи-

мый для образования биопленок и вирулентности, и фенолятный сидерофор пиохелин, который частично сходен по структуре с иерсиниабактином и не связывается с сидерокалином хозяина. У бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* обнаружено четыре разных сидерофора (орнибактин, пиохелин, сепабактин и сепациахелин). Пробиотический штамм *E. coli* Nissle 1917 продуцирует четыре сидерофора: иерсиниабактин и сальмохелин, более активные в нейтральных и щелочных условиях, а также энтеробактин и аэробактин, более активные в кислых условиях. Такие бактерии, как *Bordetella pertussis*, синтезируют один гидроксаматный сидерофор алкалагин, однако могут использовать и ксеносидерофоры разных классов (энтеробактин, феррихром и десферриоксамин В), синтезируемые другими микроорганизмами. У *B. bronchiseptica* спектр дополнительных ксеносидерофоров еще шире – они могут использовать аэробактин, феррихризин, феррикронин, феррирубин, протохелин, шизокинен, вицибактин и пиовердин.

Необходимость для патогенных бактерий синтезировать и/или использовать разные сидерофоры хорошо иллюстрируется результатами сравнения двух сидерофоров кишечной палочки: катехолатного энтеробактерина (константа ассоциации 10^{52}) и гидроксаматного аэробактерина, обладающего гораздо меньшим аффинитетом к железу (константа ассоциации 10^{23}). У аэробактерина выявился целый ряд преимуществ в организме хозяина. Он не узнается сидерокалином, более эффективно экспрессируется в условиях дефицита железа, лучше растворим в водной среде, химически более стабилен, более эффективен при низкой концентрации железа и доставляет его непосредственно к местам метаболического использования. Более того, по сравнению с катехолатными сидерофорами, биосинтез, экспорт и поглощение аэробактерина, как и многих других гидроксаматных сидерофоров, энергетически более выгодны.

По современным представлениям, именно комбинация продуцируемых патогеном сидерофоров определяет его «репликативные ниши» и модулирует реакцию хозяина на инфекцию [3].

Сидерофоры возбудителей ООИ. Сидерофоры играют важную роль в физиологии и вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. Это подтверждено многолетними исследованиями фенолятного сидерофора *Yersinia pestis* иерсиниаактерина (Ybt), который кодируется островом высокой патогенности (HPI-1) в составе нестабильного хромосомного *pgm*-локуса [43]. Хотя этот сидерофор подробно изучен как на модели *Y. pestis*, так и других синтезирующих его патогенных энтеробактерий, у него продолжают обнаруживаться все новые функции, и механизм его участия в патогенезе чумы остается предметом изучения и в настоящее время. У Ybt выявлена антиоксидантная активность [44], а также способность связывать ионы цинка [45] и меди [46]. Последнее свойство делает бактерии толерантными к токсичности меди, накапливающейся в местах вос-

паления и внутри макрофагов. Более того, у комплекса Ybt с медью обнаружена активность супероксиддисмутазы, снижающей токсичность радикалов и способствующей выживанию бактерий в макрофагах. Эти исследования показали, что Ybt необходим возбудителю чумы не только для ассимиляции железа в организме животных, но и для защиты бактерий от бактерицидного действия систем врожденного иммунитета хозяина. Помимо иерсиниабактина, у *Yersinia pestis* обнаружен гидроксаматный сидерофор – иерсиниахелин (Ych), который кодируется хромосомным *usu*-локусом [47]. Анализ функциональной активности Ych после клонирования генов его биосинтеза в клетках кишечной палочки выявил у него антиоксидантные свойства.

Возбудитель туляремии *Francisella tularensis* продуцирует поликарбоксилатный сидерофор ризоферрин, который кодируется консервативным кластером генов *fsl A-F* (*Francisella siderophore locus*) и контролируется репрессором Fur [48]. В этот кластер, помимо генов биосинтеза и экспорта сидерофора, входит еще и рецептор наружной мембраны, необходимый для транспорта нагруженного железом ризоферрина внутрь бактерий. При этом рецептор не имеет значительной гомологии с известными рецепторами сидерофоров, и гены, которые кодируют комплекс белков TonB – ExbB – ExbD, необходимых для транспорта сидерофоров через внутреннюю мембрану, отсутствуют у *F. tularensis*. Эти данные свидетельствуют о нетипичности сидерофор-зависимой системы ассимиляции железа у возбудителя туляремии, которая дополняется системой ассимиляции двухвалентного железа, состоящей из белка наружной мембраны FurA, паралога рецептора сидерофора FslE, и белка внутренней мембраны FeoB [49]. Установлено, что у возбудителя туляремии белок FurA участвует как в сидерофор-зависимой, так и в сидерофор-независимой системе ассимиляции железа. Транскриптомный анализ макрофагов, инфицированных штаммом Schu S4, показал, что *fsl*-гены индуцируются во время инфекции [50]. Делеция гена *furA* приводила к частичной аттенуации тулярийного микроба, в то время как отсутствие FslE и FurA – к полной утрате вирулентности [51].

Железо является необходимым питательным элементом и для возбудителя холеры. Около 1 % всех генов *Vibrio cholerae* кодируют различные системы транспорта железа [52]. Благодаря такому разнообразию механизмов получения этого элемента из окружающей среды, вибрионам удается приспосабливаться к различным условиям обитания. *V. cholerae* секретирует катехолатный сидерофор вибриобактин, гены биосинтеза и транспорта которого объединены в два кластера и находятся на большой хромосоме. Считалось, что благодаря особой структуре этого сидерофора, вибрионы способны уклоняться от взаимодействия с сидерокалином-2 [53]. Однако группой ученых из США доказано, что вибриобактин также подвержен действию сидерокалина-2 [54].

По всей видимости, это единственный сидерофор, синтезируемый возбудителем холеры, так как мутанты с делетированными генами биосинтеза вибриобактина не проявляют сидерофорной активности на индикаторных средах. В то же время патоген может использовать для своей жизнедеятельности ксеносидерофоры, которые синтезируют другие микроорганизмы [21]. Так, в геноме *V. cholerae* имеются гены *irgA* и *vctA*, кодирующие рецепторы энтеробактина, который наиболее активно используется патогеном в момент колонизации тонкого кишечника.

У возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis* обнаружены два сидерофора: петробактин (антрахелин) и бациллобактин (антрабактин). Установлено, что оба сидерофора необходимы для ассимиляции бактериями железа, однако роль бациллобактина в этом процессе менее выражена [55]. Петробактин, который не узнается сидерокалином-2, является важным фактором вирулентности бактерий, поскольку не продуцирующие его мутанты становятся авирулентными [56]. Петробактин играет ключевую роль на начальных стадиях сибиреязвенной инфекции, способствуя прорастанию спор, а также участвуя в ассимиляции железа и размножении бактерий в организме хозяина. Экспрессия петробактина активируется в железодефицитных условиях организма хозяина, однако она в меньшей степени зависит от концентрации железа, чем продукция большинства других бактериальных сидерофоров. Так, *in vitro* он синтезируется и в средах для спорообразования, богатых железом, при этом он не экспортируется, а остается внутри клеток и защищает их от окислительного стресса [57]. Вероятнее всего, существуют и другие механизмы регуляции биосинтеза петробактина в организме хозяина. Экспрессия бациллобактина на начальной стадии инфекции подавляется различными факторами хозяина, но активируется на поздних стадиях и, наряду с продукцией петробактина, способствует переходу вегетативных клеток в споры, существенному этапу для трансмиссии *B. anthracis* между млекопитающими [55]. Регуляция биосинтеза бациллобактина, в отличие от петробактина, в значительной степени зависит от концентрации железа [58].

Таким образом, различные сидерофоры вносят значительный вклад в развитие инфекционного процесса и непосредственно влияют на вирулентность возбудителей особо опасных инфекций.

Изучение сидерофоров патогенных бактерий является в настоящее время наиболее динамично развивающейся областью медицинской микробиологии. Несмотря на значительные успехи в области изучения структуры и функций этих разнообразных молекул, до сих пор остается много вопросов, связанных с расшифровкой механизмов их биосинтеза и транспорта. Перспективным направлением фундаментальных исследований сидерофоров является выяснение их многообразной роли в патогенезе бактериальных инфекций и особенностей регуля-

ции их экспрессии на разных этапах инфекционного процесса.

Анализ данных литературы свидетельствует, что фундаментальные исследования биологии и химии сидерофоров открыли огромные перспективы их практического применения в биотехнологии и медицине. За последние годы получено множество данных о возможности использования сидерофоров в сельском хозяйстве и пищевой индустрии для биологической рекультивации земель и очистки растворов от тяжелых металлов. Все более широкое применение сидерофоры находят и в медицине для лечения разных связанных с железом дисфункций. Зарубежными учеными опубликовано много работ о возможности практического применения сидерофоров для диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Обзор этих публикаций станет предметом нашего отдельного сообщения. Очевидно, что применение сидерофоров в медицинской практике находится в настоящее время на начальном этапе своего развития. Для того чтобы довести научные исследования до широкого практического использования, потребуются усилия многих ученых разного профиля, которые в ближайшем будущем, несомненно, приведут к созданию высокоэффективных медицинских препаратов.

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

References / Список литературы

- Begg S.L. The role of metal ions in the virulence and viability of bacterial pathogens. *Biochem. Soc. Trans.* 2019; 47(1):77–87. DOI: 10.1042/BST20180275.
- Johnstone T.C., Nolan E.M. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Trans.* 2015; 44(14):6320–39. DOI: 10.1039/c4dt03559c.
- Holden V., Bachman M.A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallicomics*. 2015; 7(6):986–95. DOI: 10.1039/c4mt00333k.
- Tonziello G., Caraff E., Pinchera B., Granata G., Petrosillo N. Present and future of siderophore-based therapeutic and diagnostic approaches in infectious diseases. *Infect. Dis. Rep.* 2019; 11:30–6. DOI: 10.4081/idr.2019.8208.
- Prabhakar P.K. Bacterial siderophores and their potential applications: a review. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2020; 13(4):295–305. DOI: 10.2174/1874467213666200518094445.
- Khasheii B., Mahmoodi P., Mohammadzadeh A. Siderophores: importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiol. Res.* 2021; 250:126790. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126790.
- Obando S.T.A., Babykin M.M., Zinchenko V.V. A cluster of five genes essential for the utilization of dihydroxamate xenosiderophores in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr. Microbiol.* 2018; 75(9):1165–73. DOI: 10.1007/s00284-018-1505-1.
- Becker K.W., Skaar E.P. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. *FEMS Microbiol. Rev.* 2014; 38(6):1235–49. DOI: 10.1111/1574-6976.12087.
- Golonka R., Yeoh B.S., Vijay-Kumar M. The iron tug-of-war between bacterial siderophores and innate immunity. *J. Innate Immun.* 2019; 11(3):249–62. DOI: 10.1159/000494627.
- Núñez G., Sakamoto K., Soares M.P. Innate nutritional immunity. *J. Immunol.* 2018; 201(1):11–8. DOI: 10.4049/jimmunol.1800325.
- Kontoghiorghes G.J., Kontoghiorghes C.N. Iron and chelation in biochemistry and medicine: new approaches to controlling iron metabolism and treating related diseases. *Cells*. 2020; 9(6):1456. DOI: 10.3390/cells9061456.
- Balla J., Balla G., Zarjou A. Ferritin in kidney and vascular related diseases: novel roles for an old player. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019; 12(2):96. DOI: 10.3390/ph12020096.
- Kortman G.A.M., Boleij A., Swinkels D.W., Tjalsma H. Iron availability increases the pathogenic potential of *Salmonella typhimurium* and other enteric pathogens at the intestinal epithelial interface. *PLoS One*. 2012; 7(1):e29968. DOI: 10.1371/journal.pone.0029968.
- Ellermann M., Arthur J.C. Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions. *Free Radic. Biol. Med.* 2017; 105:68–78. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.489.
- Palmer L.D., Skaar E.P. Transition metals and virulence in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 2016; 50:67–91. DOI: 10.1146/annurev-genet-120215-035146.
- Caza M., Kronstad J.W. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 3:80. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00080.
- Cain T.J., Smith A.T. Ferric iron reductases and their contribution to unicellular ferrous iron uptake. *J. Inorg. Biochem.* 2021; 218:111407. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2021.111407.
- Hider R.C., Kong X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 2010; 27(5):637–57. DOI: 10.1039/b906679a.
- Kramer J., Özkaya Ö., Kümmerli R. Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020; 18:152–63. DOI: 10.1038/s41579-019-0284-4.
- Tan Z., Chekabab S.M., Yu H., Yin X., Diarra M.S., Yang C., Gong J. Growth and virulence of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in iron uptake. *ACS Omega*. 2019; 4(8):13218–30. DOI: 10.1021/acsomega.9b01367.
- Byun H., Jung I.J., Chen J., Larios-Valencia J., Zhu J. Siderophore piracy enhances *Vibrio cholerae* environmental survival and pathogenesis. *Microbiology (Reading)*. 2020; 166(11):1038–46. DOI: 10.1099/mic.0.000975.
- Gulick A.M. Nonribosomal peptide synthetase biosynthetic clusters of ESKAPE pathogens. *Nat. Prod. Rep.* 2017; 34(8):981–1009. DOI: 10.1039/c7np00029d.
- Carroll C.S., Moore M.M. Ironing out siderophore biosynthesis: a review of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)-independent siderophore synthetases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2018; 53(4):356–81. DOI: 10.1080/10409238.2018.1476449.
- Chen W.J., Kuo T.Y., Hsieh F.C., Chen P.Y., Wang C.S., Shih Y.L., Lai Y.M., Liu J.R., Yang Y.L., Shih M.C. Involvement of type VI secretion system in secretion of iron chelator pyoverdine in *Pseudomonas taiwanensis*. *Sci. Rep.* 2016; 6:32950. DOI: 10.1038/srep32950.
- Kirienko N.V., Ausubel F.M., Ruvkun G. Mitophagy confers resistance to siderophore-mediated killing by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2015; 112(6):1821–6. DOI: 10.1073/pnas.1424954112.
- Freinbichler W., Colivicchi M.A., Stefanini C., Bianchi L., Ballini C., Misini B., Weinberger P., Linert W., Vareslija D., Tipton K.F., Corte L.D. Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011; 68(12):2067–79. DOI: 10.1007/s00018-011-0682-x.
- Troxell B., Hassan H.M. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 3:59. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00059.
- Schalk I.J., Hannauer M., Braud A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* 2011; 13(11):2844–54. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x.
- Brickman T.J., Armstrong S.K. Temporal signaling and differential expression of *Bordetella* iron transport systems: the role of ferrimones and positive regulators. *Biomaterials*. 2009; 22(1):33–41. DOI: 10.1007/s10534-008-9189-9.
- Jemielita M., Wingreen N.S., Bassler B.L. Quorum sensing controls *Vibrio cholerae* multicellular aggregate formation. *Elife*. 2018; 7:e42057. DOI: 10.7554/eLife.42057.
- Page M.P.G. The role of iron and siderophores in infection and the development of siderophore antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 2019; 69(7):529–37. DOI: 10.1093/cid/ciz825.
- Kang D., Revtovich A.V., Chen Q., Shah K.N., Cannon C.L., Kirienko N.V. Pyoverdine-dependent virulence of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2048. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02048.
- Adler C., Corbalan N.S., Peralta D.R., Pomares M.F., de Cristobal R.E., Vincent P.A. The alternative role of enterobactin as an oxidative stress protector allows *Escherichia coli* colony development. *PLoS One*. 2014; 9(1):e84734. DOI: 10.1371/journal.pone.0084734.
- Li C., Pan D., Li M., Wang Y., Song L., Yu D., Zuo Y., Wang K., Liu Y., Wei Z., Lu Z., Zhu L., Shen X. Aerobactin-mediated iron acquisition enhances biofilm formation, oxidative stress resistance, and virulence of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Front. Microbiol.* 2021; 12:699913. DOI: 10.3389/fmicb.2021.699913.
- Jimenez P.N., Koch G., Thompson J.A., Xavier K.B., Cool R.H., Quax W.J. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76(1):46–65. DOI: 10.1128/MMBR.05007-11.

36. May T., Okabe S. Enterobactin is required for biofilm development in reduced-genome *Escherichia coli*. *Environ. Microbiol.* 2011; 13(12):3149–62. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02607.x.
37. Kang D., Kirienko N.V. Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol.* 2018; 56:449–57. DOI: 10.1007/s12275-018-8114-3.
38. Rizzi A., Roy S., Bellenger J.P., Beauregard P.B. Iron homeostasis in *Bacillus subtilis* requires siderophore production and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85:e2439–18. DOI: 10.1128/AEM.02439-18.
39. Rada B., Jendrysek M.A., Pang L., Hayes C.P., Yoo D.G., Park J.J., Moskowitz S.M., Malech H.L., Leto T.L. Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase. *PLoS One.* 2013; 8(1):e54205. DOI: 10.1371/journal.pone.0054205.
40. Sewell A.K., Han M., Qi B. An unexpected benefit from *E. coli*: how enterobactin benefits host health. *Microb. Cell.* 2018; 5(10):469–71. DOI: 10.15698/mic2018.10.653.
41. McRose D.L., Seyedsayamdost M.R., Morel F.M.M. Multiple siderophores: bug or feature? *J. Biol. Inorg. Chem.* 2018; 23:983–93. DOI: 10.1007/s00775-018-1617-x.
42. Sia A.K., Allred B.E., Raymond K.N. Siderocalins: siderophore binding proteins evolved for primary pathogen host defense. *Cur. Opin. Chem. Biol.* 2013; 17(2):150–7. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.11.014.
43. Perry R.D., Fetherston J.D. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect.* 2011; 13(10):808–17. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.04.008.
44. Paauw A., Leverstein-van Hall M.A., van Kessel K.P., Verhoef J., Fluit A.C. Yersiniabactin reduces the respiratory oxidative stress response of innate immune cells. *PLoS One.* 2009; 4(12):e8240. DOI: 10.1371/journal.pone.0008240.
45. Bobrov A.G., Kirillina O., Fetherston J.D., Miller M.C., Burleson J.A., Perry R.D. The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicemic plague in mice. *Mol. Microbiol.* 2014; 93(4):759–75. DOI: 10.1111/mmi.12693.
46. Chaturvedi K.S., Hung C.S., Giblin D.E., Urushidani S., Austin M.A., Dinauer M.C., Henderson J.P. Cupric yersiniabactin is a virulence-associated superoxide dismutase mimic. *ACS Chem. Biol.* 2014; 9(2):551–61. DOI: 10.1021/cb400658k.
47. Podladchikova O., Rykova V., Antonenka U., Rakin A. *Yersinia pestis* autoagglutination is mediated by HCP-like protein and siderophore yersiniachelin (Ych). *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954:289–92. DOI: 10.1007/978-1-4614-3561-7_36.
48. Ramakrishnan G., Pérez N.M., Carroll C., Moore M.M., Nakamoto R.K., Fox T.E. Citryl ornithine is an intermediate in a three-step biosynthetic pathway for rhizoferrin in *Francisella*. *ACS Chem. Biol.* 2019; 14(8):1760–66. DOI: 10.1021/acscchembio.9b00297.
49. Pérez N., Johnson R., Sen B., Ramakrishnan G. Two parallel pathways for ferric and ferrous iron acquisition support growth and virulence of the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Schu S4. Microbiologyopen.* 2016; 5(3):453–68. DOI:10.1002/mbo3.342.
50. Wehrly T.D., Chong A., Virtaneva K., Sturdevant D.E., Child R., Edwards J.A., Brouwer D., Nair V., Fischer E.R., Wicke L., Curda A.J., Kupko J.J. 3rd, Martens C., Crane D.D., Bosio C.M., Porcella S.F., Celli J. Intracellular biology and virulence determinants of *Francisella tularensis* revealed by transcriptional profiling inside macrophages. *Cell. Microbiol.* 2009; 11(7):1128–50. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01316.x.
51. Ramakrishnan G. Iron and virulence in *Francisella tularensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; 7:107. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00107.
52. Payne S.M., Mey A.R., Wyckoff E.E. *Vibrio* iron transport: evolutionary adaptation to life in multiple environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015; 80(1):69–90. DOI: 10.1128/MMBR.00046-15.
53. Li N., Zhang C., Li B., Liu X., Huang Y., Xu S., Gu L. Unique iron coordination in iron-chelating molecule vibriobactin helps *Vibrio cholerae* evade mammalian siderocalin-mediated immune response. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(12):8912–9. DOI: 10.1074/jbc.M111.316034.
54. Allred B.E., Correnti C., Clifton M.C., Strong R.K., Raymond K.N. Siderocalin outwits the coordination chemistry of vibriobactin, a siderophore of *Vibrio cholerae*. *ACS Chem. Biol.* 2013; 8(9):1882–7. DOI: 10.1021/cb4002552.
55. Hotta K., Kim C.-Y., Fox D.T., Koppisch A.T. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains. *Microbiology.* 2010; 156:1918–25. DOI: 10.1099/mic.0.039404-0.
56. Cendrowski S., MacArthur W., Hanna P. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Mol. Microbiol.* 2004; 51(2):407–17. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03861.x.
57. Hagan A.K., Plotnick Y.M., Dingle R.E., Mendel Z.I., Cendrowski S.R., Sherman D.H., Tripathi A., Hanna P.C. Petrobactin protects against oxidative stress and enhances sporulation efficiency in *Bacillus anthracis* Sterne. *mBio.* 2018; 9(6):e02079–18. DOI: 10.1128/mBio.02079-18.
58. Lee J.Y., Passalacqua K.D., Hanna P.C., Sherman D.H. Regulation of petrobactin and bacillibactin biosynthesis in *Bacillus anthracis* under iron and oxygen variation. *PLoS One.* 2011; 6(6):e20777. DOI: 10.1371/journal.pone.0020777.

Authors:

Kuznetsova D.A., Rykova V.A., Podladchikova O.N. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aanet.ru.

Об авторах:

Кузнецова Д.А., Рыкова В.А., Подладчикова О.Н. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aanet.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-23-37

УДК 616.98:579.842.23

К.А. Никифоров

Штаммы *Yersinia pestis* линии 1.ORI как этиологический агент III пандемии чумы

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

Штаммы *Yersinia pestis* линии 1.ORI берут свое начало в Китае как результат эволюции филогенетической ветви 1.ANT. Штаммы восточного биовара делятся с образованием трех основных линий эволюции: 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3. Линии 1.ORI1 и 1.ORI2 возникли в Китае, а затем распространились на восточное и западное побережье Индии соответственно. Штаммы восточного биовара широко распространились по всему миру преимущественно в результате заноса морским путем. Так, линия 1.ORI1 занесена на территорию Северной Америки. Линия 1.ORI2 получила распространение в Юго-Восточной Азии, Африке, Европе и Южной Америке. Кроме того, штаммы восточного биовара завезены и на территорию Австралии, однако формирования природных очагов не произошло. Распространение штаммов на новые территории во время третьей пандемии, как правило, происходило с участием одного штамма, который вызывал эпизоотии среди синантропных грызунов. После регистрировались вспышки среди населения портовых городов с последующим заносом в сельскую местность и формированием природных очагов при подходящих природных условиях. При отсутствии таковых возбудитель чумы элиминировался из природных биотопов, формирования природного очага не происходило. В последние десятилетия большинство случаев чумы человека в мире вызвано штаммами восточного биовара (1.ORI). Однако возникновение и распространение эволюционной линии «1» изучены недостаточно. В настоящее время для выяснения подробностей иррадиации штаммов восточного биовара не хватает как исторических данных, так и штаммов, являющихся предками для современных штаммов на территории многих стран. В результате представления о диссеминации многих ветвей эволюции штаммов восточного биовара в настоящее время имеют вид гипотез. В обзоре проведен анализ литературных данных по истории и эпидемиологии чумы за третью пандемию, поиск связи эпидемических проявлений с принадлежностью штаммов, их вызвавших, к определенным филогенетическим линиям.

Ключевые слова: чума, возбудитель чумы, восточный биовар, ветви эволюции.

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

Для цитирования: Никифоров К.А. Штаммы *Yersinia pestis* линии 1.ORI как этиологический агент III пандемии чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:23–37. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-23-37

Поступила 29.04.2021. Отправлена на доработку 11.06.2021. Принята к публ. 27.10.2021.

К.А. Nikiforov

***Yersinia pestis* Strains of the 1.ORI Line as Etiological Agent of the Plague Pandemic III**

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

Abstract. *Yersinia pestis* strains of the 1.ORI lineage originate from China as a result of evolution of the 1.ANT phylogenetic branch. Strains of the biovar orientalis are divided into three major lines of evolution: 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3. Lines 1.ORI1 and 1.ORI2 originated in China and then spread across the east and west coasts of India, respectively. Strains of the biovar orientalis have widely spread throughout the world, mainly as a result of introduction by sea. This way, the 1.ORI1 line was imported onto the territory of North America. 1.ORI2 line has spread to Southeast Asia, Africa, Europe, and South America. In addition, the strains of the biovar orientalis were brought to the territory of Australia, however, the formation of natural foci did not occur. The spread of strains to new territories during the third plague pandemic, as a rule, took place with the participation of one strain, which caused epizootics among synanthropic rodents. After that, outbreaks were recorded among the population of port cities, followed by drifting into the countryside and the formation of natural foci under suitable natural conditions. In the absence of such, the plague pathogen was eliminated from natural biotopes, and the formation of a natural focus did not occur. In recent decades, most cases of human plague in the world have been caused by strains of the biovar orientalis (1.ORI). However, the emergence and spread of the evolutionary line “1” is insufficiently studied. Currently, there is a lack of both historical data and strains that are ancestors of modern strains in many countries to clarify the details of the irradiation of strains of the biovar orientalis. As a result, the concepts of dissemination of many evolution branches of the strains, biovar orientalis are in the form of hypotheses to date. In this work, the collection and analysis of literature data on the history and epidemiology of plague over the third pandemic, a search for a connection between epidemic manifestations and the appurtenance of the strains that caused them to certain phylogenetic lineages was carried out.

Key words: plague, plague agent, biovar orientalis, branches of evolution.

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

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

Citation: Nikiforov K.A. *Yersinia pestis* Strains of the 1.ORI Line as Etiological Agent of the Plague Pandemic III. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 3:23–37. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-23-37

Received 29.04.2021. Revised 11.06.2021. Accepted 27.10.2021.

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

Yersinia pestis – возбудитель чумы – зоонозной природно-очаговой особо опасной бактериальной инфекционной болезни с трансмиссивным механизмом передачи. Штаммы возбудителя чумы циркулируют в различных ландшафтно-климатических регионах, что обуславливает значительное внутривидовое разнообразие *Y. pestis*. Активные очаги чумы в настоящее время находятся на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды [1].

Вид *Y. pestis* является ветвью эволюции возбудителя псевдотуберкулеза – *Yersinia pseudotuberculosis*, от которого он отделился около 20 тыс. лет назад [2]. Сравнительный анализ полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* показал идентичность их генов-гомологов на 97–99 %, а гена 16S рПНК – на 100 %.

В структуре вида, согласно усовершенствованной классификации, основанной на данных полногеномного секвенирования, выделяют семь подвидов: основной и шесть неосновных подвидов: тибетский, кавказский, ангольский, центральноазиатский, цинхайский, улегейский. В центральноазиатский подвид включено четыре биовара: алтайский, гиссарский, таласский, *microtus* [3]. Высоковирулентные и эпидемически значимые штаммы основного подвида делятся на три биовара: античный, средневековый и восточный. Штаммы античного биовара формируют несколько ветвей эволюции: 0.ANT, 1.ANT, 2.ANT, 3.ANT, 4.ANT. Линия 1.ANT является предковой по отношению к штаммам группы *intermedium* (1.IN) и восточному биовару (1.ORI), а линия 2.ANT дала начало средневековому биовару (2.MED).

В истории человечества описано три пандемии чумы: первая началась с чумы Юстиниана (541–544 гг.) и продолжалась с перерывами до 750 г. н.э.; вторая известна как «черная смерть» (Европа, 1347–1351 гг.) вместе с последующими волнами, в частности Великой чумой (1665–1666 гг.); третья начала свой путь в Китае в 1850-х гг. и распространилась по всему миру в виде серии эпидемий к середине XX в. [4, 5]. В отношении более ранних вспышек, таких как чума Афин (430–427 до н.э.) и Антонинова чума (165–180 гг. н.э.), отсутствуют доказательства, позволяющие связать их с *Y. pestis*.

Ранее считалось, что пандемии были вызваны штаммами античного, средневекового и восточного биоваров *Y. pestis*, позднее M. Drancourt *et al.* высказали точку зрения, что все три пандемии чумы имели в качестве этиологического агента штаммы, близкие восточному биовару [6]. Полногеномное секвенирование штаммов периода первой пандемии показало, что они наиболее близки линии 0.ANT [5]. M.A. Spyrou *et al.* выполнили полногеномное секвенирование штаммов, выделенных из костных останков жертв второй пандемии, и установили, что эти штаммы являются предшественниками первой линии эволюции *Y. pestis*, объединяющей 1.ANT, 1.ORI, 1.IN [7].

Штаммы линии 1.ORI сформировались в Китае в результате эволюции филогенетической ветви 1.ANT,

штаммы которой в настоящее время встречаются в Восточной и Центральной Африке (Демократическая Республика Конго, Уганда, Кения). G. Morelli *et al.* высказали гипотезу, что штаммы линии 1.ANT попали из Китая в Африку на кораблях адмирала Чжэн Хэ в 1409–1433 гг. [8]. Однако линия 1.ANT1 возникла 628–6914 лет назад, что предшествует путешествиям Чжэн Хэ. Штаммы этой линии могли быть завезены в Восточную и Центральную Африку альтернативным путем, например арабскими торговцами.

В настоящее время возникновение и распространение эволюционной линии «1» изучено недостаточно. Установлено, что штаммы, предшествовавшие штаммам 1.ANT, были причиной второй пандемии чумы [7], берущей начало в Нижнем Поволжье и Черноморье (1346 г.), распространившейся по Европе, вызвав эпидемию «черной смерти». Дальнейшие пути распространения линии «1» остаются неясными. Известно, что штаммы 1.ANT укоренились в Восточной и Центральной Африке, а штаммы более эволюционно молодой линии 1.IN эндемичны для Китая. Согласно современным представлениям, штаммы линии 1.IN происходят от 1.ANT. При этом в Китае не циркулируют штаммы линии 1.ANT, таким образом, линия 1.ORI, возможно, эволюционировала из линии 1.IN, штаммы которой распространены на юге и в центре Китая. Высказано предположение, что штаммы возбудителя чумы второй пандемии были занесены на территорию Китая и дали начало эволюционной линии 1.IN, а исходные штаммы были элиминированы [5, 9].

В настоящее время остается нерешенным ряд вопросов по эволюции линии «1», вызвавшей две пандемии. Неясен эволюционный путь от линии 1.ANT до 1.IN, неизвестны причины исчезновения штаммов 1.ANT с территории Китая. Возможно, дальнейшие исследования палеогеномов возбудителя чумы дадут ответы на эти вопросы, в результате чего удастся получить схему полной эволюции этого вида.

Третья пандемия чумы началась в провинции Юньнань Китая в 1855 г. и была вызвана штаммами *Y. pestis* восточного биовара (1.ORI). В этой же провинции циркулируют штаммы линии 1.IN3, возможно, являющиеся предками восточного биовара. С течением времени штаммы восточного биовара распространились на территории разных континентов, с образованием трех ветвей эволюции: 1.ORI1, 1.ORI2 и 1.ORI3. С 1899–1900 гг. пароходы завезли чуму в Африку, Австралию, Европу, на Гавайи, в Индию, Японию, на Ближний Восток, Филиппины, в Северную и Южную Америки.

Считается, что штаммы 1.ORI1 были занесены с территории Китая в США [10]. В настоящее время чума эндемична для США, природные очаги расположены в штатах Калифорния, Аризона, Колорадо, Нью-Мексико и Юта. Кроме того, в литературе имеются данные, что штаммы ветви 1.ORI1 занесены с территории Китая (Гонконг) во Вьетнам

[8, 11]. Это подтверждают данные полногеномного секвенирования штаммов восточного биовара из Вьетнама [12].

В работе G. Morelli *et al.* с помощью филогенетического анализа показано существование девяти волн радиации ветви 1.ORI2: 1.ORI2a – берет свое начало в Китае, откуда в 1896 г. на корабле из Гонконга занесена в Бомбей; 1.ORI2ii – распространилась по территории Юго-Восточной Азии; 1.ORI2iii – охватила Северную Африку (Марокко, Сенегал); 1.ORI2iv – распространилась в Центральную и Южную Африку; 1.ORI2v – характерна для Южной Америки; 1.ORI2vi – была распространена в Европе; 1.ORI2vii – еще одна линия эволюции в Центральной и Южной Африке; 1.ORI2viii – эта линия попала из Индии в Европу и оттуда в Южную Америку; 1.ORI2ix – линия берет начало в Китае, откуда привнесена во Вьетнам и Мьянму, после чего состоялся обратный занос из Мьянмы в китайскую провинцию Юньнань [8, 11]. В результате штаммы ветви 1.ORI2 распространились в Европе, Южной Америке, Африке, Юго-Восточной Азии.

Штаммы ветви 1.ORI3 занесены из западной части Индии на территорию Турции и Мадагаскара.

К настоящему времени штаммы восточного биовара циркулируют главным образом в природных очагах на территории Мадагаскара, Северной Америки, Южной Америки, Юго-Восточной Азии. Крупная зарегистрированная вспышка легочной чумы произошла на Мадагаскаре в 2017 г., этиологическим агентом которой выступили штаммы восточного биовара, когда заразились более 500 человек [13]. Всего в мире за 2018 г. зарегистрировано 243 случая чумы человека, из которых 41 закончился смертельным исходом. На Мадагаскаре зарегистрировано 104 (34 смерти), в Боливии – 1 смертельный случай, в Перу – 4 случая (1 смерть), в США – 1 случай заражения. В 2019 г. 148 случаев чумы человека зарегистрированы на территории шести стран: Республика Мадагаскар (88 случаев), Республика Уганда (2 случая), Демократическая Республика Конго (ДРК) (50 случаев), Китайская Народная Республика (КНР) (5 случаев), Монголия (2 случая) и США (1 случай). В 2020 г. зарегистрировано 535 случаев чумы человека в четырех странах мира (37 с летальным исходом): ДРК (520 случаев; 31 летальный), КНР (4 случая; 2 летальных), Монголия (6 случаев; 3 летальных) и США (5 случаев; 1 летальный) [14].

Большинство случаев чумы человека за последние десятилетия в мире вызваны штаммами восточного биовара (1.ORI), которые благодаря развитию мореходства и торгово-экономических связей между странами в XX в. получили широкое распространение по всему миру. Однако многие теории по иррадиации этой болезни в течение последней пандемии остаются не подтвержденными генетически и базируются только на исторических данных, кроме того, пути распространения некоторых генетических линий не изучены.

Целью настоящей работы стал сбор и анализ литературных данных по истории и эпидемиологии чумы во время третьей пандемии, а также поиск связи эпидемических проявлений с принадлежностью штаммов, их вызвавших, к определенным филогенетическим линиям.

Возникновение восточного биовара и формирование основных ветвей эволюции 1.ORI. Свое начало линия эволюции 1.ORI берет в Китае. Основываясь на исторических данных, Wu Lien-teh утверждал, что чума присутствовала испокон веков внутри Центрально-Азиатского плато, которое он считал первоначальным местом возникновения инфекции [11, 15].

В конце XVIII в. вспышки чумы отмечены в провинции Юньнань в Китае. Согласно Wu Lien-teh, в течение первой половины XIX в. болезнь укоренилась на западе провинции Юньнань. Чума достигла столицы провинции Юньнань, г. Куньмин, в 1866 г., в 1894 г. пришла в Кантон и Гонконг и в 1867 г. – в Пак-Хой в Южном Квантунге [11]. Пак-Хой был первым портовым городом Китая, пораженным чумой во время третьей пандемии. В Сямэнь, главный порт юга Фуцзянь, чума занесена в 1894 г. К 1899 г. распространение болезни достигло порта Нючжуан на юге Маньчжурии, а к 1901 г. – Фуцжоу провинции Фуцзянь. В период с 1937 по 1946 год заболеваемость чумой была высокой. После этого начата массивная кампания по дератизации, которая принесла свои плоды: чума стала регистрироваться только в сельской местности и, как правило, в бубонной форме. Чума укоренилась в некоторых частях южного Китая, а также на северо-западе страны.

С середины 1950-х гг. эпидемии чумы на территории Китая находились под контролем, а с 1980-х гг. в Китае ежегодно проводятся программы активного эпиднадзора за чумой животных. В 1986–2005 гг. вспышка чумы произошла в западных районах провинции Юньнань, а затем распространилась на восток, затронув 29 из 129 уездов. О двух случаях чумы человека, вызванных штаммами восточного биовара в провинции Юньнань, сообщено в 2016 г.

Таким образом, считается, что штаммы восточного биовара сформировались на территории Китая в результате эволюции линии 1.IN, а в дальнейшем они разделились на генетические ветви 1.ORI1 и 1.ORI2. Ветвь 1.ORI1 занесена во Вьетнам и Калькутту (Индия), получив распространение в восточной части Индии. Позже морским путем ветвь 1.ORI1 достигла территории США с кораблем из Гонконга [11, 16]. Ветвь 1.ORI2 иррадиировала в Западную Индию (1.ORI2a), откуда распространилась в Европу (1.ORI2vi, 1.ORI2viii), Южную Америку (1.ORI2v, 1.ORI2viii) и другие страны [8].

В настоящее время штаммы восточного биовара в Китае циркулируют в Юньнань-Гуандун-Фуцзянском Юго-Восточном природном очаге, для которого характерен тропический климат, но большую часть покрывают горы, где, скорее всего, и со-

храняется возбудитель чумы, поскольку для его распространения среди грызунов необходимы блохи, численность которых в тропических регионах, как правило, мала из-за высокой влажности, приводящей к гибели их личинок.

Второй страной, где происходило формирование основных ветвей эволюции восточного биовара, является Индия. Природные очаги на юге Индии появились после заноса из Китая штаммов *Y. pestis* восточного биовара в Бомбей (Мумбаи) в 1896 г. во время третьей пандемии. В 1898 г. случаи чумы отмечены в штатах Бомбей (ныне Махараштра) и Майсуре (ныне Карнатака) [17]. Инфекция распространилась из тогдашнего Бомбея (Мумбаи) в прилегающие районы штата Хайдарабад (ныне Мадхья-Прадеш), вызвав эпидемию в 1911 г. в г. Хайдарабаде, за время которой погибло около 16 тыс. человек.

Природные очаги в Гималаях, напротив, имеют давнюю историю и существуют в районах Гархвал и Кумаон индийского штата Уттаракханд с 1823 г., где, согласно литературным данным, чума впервые описана в XVII в. [18]. Из этого можно сделать предположение, что там циркулируют штаммы не восточного биовара.

К середине XX в. чума в Индии перестала вызывать вспышки в городах, став более характерной для сельских районов [11]. В 50-х гг. в Индии чума закрепилась в природных очагах следующих регионов: на севере страны – у подножия Гималаев, в провинциях Агра и Ауд (ныне штат Уттар-Прадеш) и штате Бихар к северу от Ганга; в центральной части Индии – в водоразделах гор Виндхья, хребтов Бханрер, Майкал и Махадео; на юге Индии – в водоразделах у гор Западные Гаты в штатах Бомбей (ныне Махараштра) и Майсуре (ныне Карнатака), в округах Салем, Коимбатур, Мадур и водоразделе гор Нилгири [17].

В 1994 г. имело место необычно большое число случаев смерти домашних крыс в Сурате штата Гуджарат. А за этим последовала вспышка чумы в юго-центральной и юго-западной частях Индии с эпицентром в Сурате. Зарегистрировано 693 случая с 56 смертями в пяти штатах. K.N. Mahale *et al.* провели полногеномное секвенирование двух штаммов, выделенных во время этой вспышки в Сурате, установив их принадлежность к линии 1.ORI3 восточного биовара, что подтверждает гипотезу распространения этой линии из Индии на Мадагаскар [19]. Также K.N. Mahale *et al.* провели полногеномное секвенирование штамма, выделенного из диких грызунов в Хосуре, штат Тамилнад, в 1998 г., и установили его принадлежность к линии 1.ORI1.

Таким образом, после заноса из Китая на территории Индии циркулируют штаммы всех трех основных линий восточного биовара: 1.ORI1 – получила распространение в восточной части страны; 1.ORI2 – иррадиировала по всему миру, сформировав девять генетических радиаций; 1.ORI3 – возможно является потомком эволюции 1.ORI2a (циркуляция их отмечена в приморских областях западной

части Индии). Впоследствии штаммы линии 1.ORI3 привнесены на Мадагаскар и в Турцию. В Индии было множество случаев чумы в городах, с течением времени санитарно-гигиенические условия в стране улучшились, и чума укоренилась в природных биотопах, занимающих возвышенные территории.

Формирование и распространение основных линий эволюции восточного биовара

Линия 1.ORI1

США. Штаммы линии 1.ORI1 циркулируют на территории Северной Америки. Согласно историческим записям, чума занесена в Соединенные Штаты в 1899 г. на корабле из Гонконга, который пришвартовался на Гавайях, а затем в Сан-Франциско [8] (рис. 1). Последняя городская вспышка легочной чумы произошла в 1924–1925 гг. в Лос-Анджелесе. С тех пор случаи чумы человека регистрировались преимущественно в сельской местности. Штаты, где происходили случаи чумы, расположены в основном на юго-западном и тихоокеанском западном побережье, а позднее чуму стали регистрировать в штатах на востоке и севере. Выделяются следующие особенности эпидемиологии чумы на территории США: большее число случаев в новых жилых районах при расселении на территорию энзоотических очагов в сельской местности и значительная частота передачи домашними кошками. В последние годы заболеваемость чумой в США держится на уровне нескольких случаев в год, чаще всего – в Нью-Мехико, Колорадо, Аризоне, являющихся горными штатами, и в Калифорнии. Обращает на себя внимание тот факт, что природные очаги чумы и большая часть случаев чумы человека характерны для штатов с горными массивами, горными степями и полупустынями. На Гавайи чума занесена в Гонолулу в ноябре 1899 г. на кораблях из Гонконга. Заболеваемость сохранялась в течение примерно десяти лет в Гонолулу и соседних районах, а затем чума распространилась на другие острова архипелага [11]. Всего за период 1899–1949 гг. было 416 случаев чумы человека на Гавайях. После этого здесь не отмечалось ни одного случая чумы, скорее всего, это связано с климатическими особенностями в виде большого количества осадков и тропического пассатного климата, которые не дали сформироваться природному очагу с резервуаром в виде диких грызунов и блохами как основными переносчиками. Чума вызывала только вспышки в населенных пунктах и не смогла закрепиться в природных биотопах.

Канада. В связи с ожидаемым заносом чумы из США в 1938 г. в Западной Канаде проведено масштабное исследование диких грызунов, однако не обнаружено ни одной положительной пробы [20]. В 1939 г. зафиксирована эпизоотия в степной зоне юго-восточной части провинции Альберта. Распространение инфекции от провинции Альберта до смежной провинции Саскачеван отмечено в 1946 г. На территории этих двух провинций за последние десятилетия периодически находили луго-

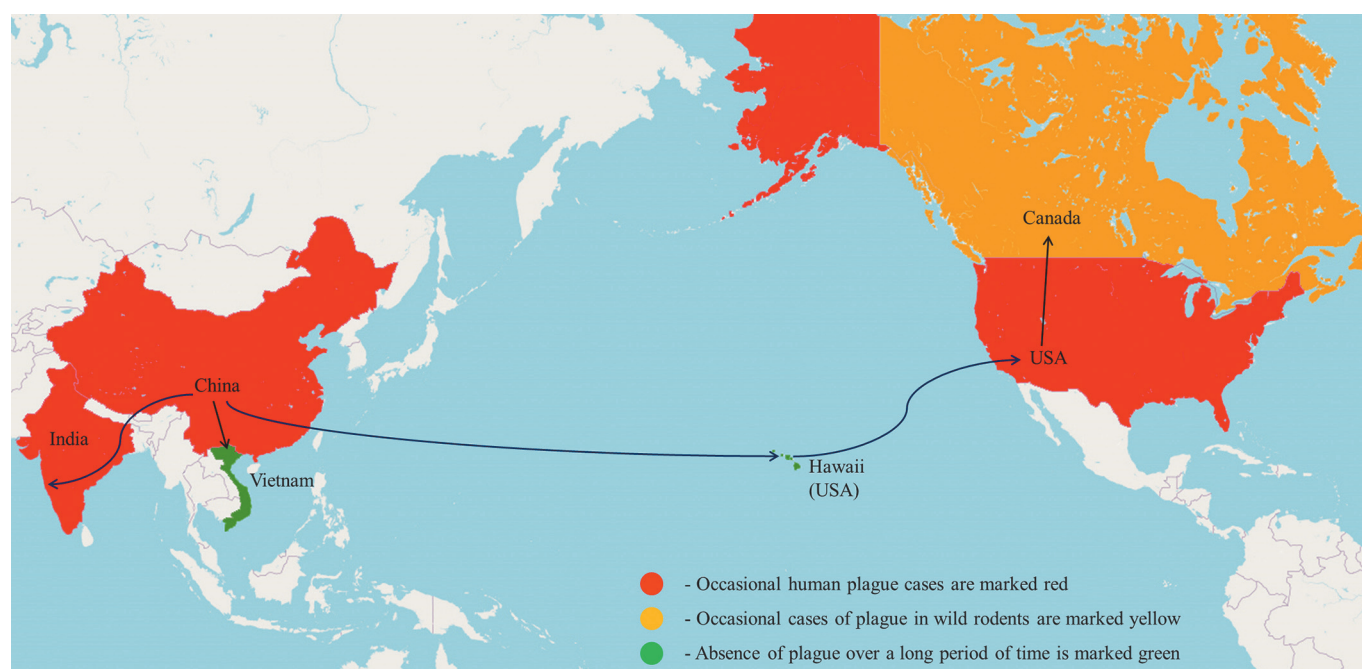


Рис. 1. Схема распространения штаммов ветви 1.ORI1. Для рисунка использована карта с сайта OpenStreetMap (www.openstreetmap.org/copyright):

красный цвет – периодические случаи чумы человека; желтый – периодические случаи чумы диких грызунов; зеленый – отсутствие чумы долгое время

Fig. 1. Scheme of distribution of 1.ORI1 strains. The map used for the figure is from the OpenStreetMap website (www.openstreetmap.org/copyright)

вых собак, зараженных чумой. Последние случаи чумы у луговых собак зарегистрированы в 2010 и 2017 гг. на территории степной зоны юго-западной части провинции Саскачеван. Случаев заражения чумой человека на территории Канады официально не зафиксировано.

Ветвь эволюции 1.ORI2

Эта ветвь получила широкое распространение по всему миру. Штаммы линии 1.ORI2 берут свое начало с территории Китая, откуда занесены в Западную Индию (радиация 1.ORI2a), а затем – в Юго-Восточную Азию, Австралию, Северную, Западную, Центральную и Южную Африку, Южную Америку (радиация 1.ORI2v, 1.ORI2viii), Ближний Восток и Европу (радиация 1.ORI2vi, 1.ORI2viii) [8].

Юго-Восточная Азия. В страны Юго-Восточной Азии штаммы чумы линии 1.ORI2 занесены из Китая.

Мьянма. Считается, что чума попала на территорию Мьянмы в 1905 г. в результате заноса в Рангун с последующим формированием эндемичных очагов в городах Мейктила, Пьябве и штате Шан возле границы с китайской провинцией Юньнань, вызвав более 8 тыс. случаев в 1946–1950 гг. с преобладанием бубонной формы [21]. В июле 2010 г. сообщалось о вспышке чумы среди жителей Янгона (ранее Рангун), однако Министерство здравоохранения Мьянмы не сделало публичного заявления относительно диагноза чумы.

Камбоджа. На территорию Камбоджи чума, скорее всего, завезена в г. Пномпень из Сайгона в 1907 г.

Таиланд. В Таиланд чума, вероятно, попала морским путем из Китая, сначала поразив Бангкок в 1904 г. В общей сложности 1722 случая произошли в Бангкоке с 1905 по 1922 год [11]. Профилактические меры и улучшение санитарно-гигиенических условий принесли свои плоды: число больных снижалось с 1929 г., и чума полностью отсутствовала в стране в период 1935–1937 гг. Инфекция вновь появилась в конце 1938 г. на северо-западе страны и распространилась сначала на восток, а затем на юг. Последние случаи чумы зафиксированы в Бангкоке в начале 1940 г. После этого случаев чумы в Таиланде не зарегистрировано.

Индонезия. В Индонезии чума появилась в порту Сурабая в ноябре 1910 г. Инфекция распространялась на запад, на среднюю и западную части острова Ява. В 1920–1927 гг. ежегодно происходило от 8 тыс. до 10 тыс. смертей. Затем начался спад заболеваемости, связанный с крупномасштабной кампанией по вакцинации живой вакциной Оттена. Заболеваемость периода 1945–1947 гг. была низкой [11]. Чума не регистрировалась на Яве в 1961–1967 гг. Но болезнь вновь появилась в горных деревнях округа Бойолали провинции Центральная Ява с 1968 по 1970 год, ограничиваясь в основном отдаленными и относительно недоступными высокогорьями, расположенными между двух вулканов в районах Село и Тьепого [22].

Вьетнам. Впервые чума занесена во Вьетнам морским путем с синантропными крысами с территории Китая. Первоначально заражен г. Нячанг в 1898 г., после чего заболевание распространилось на прибрежные территории и вглубь страны. В 1943 г.

чума обнаружена на плато Тай Нгуен в центре страны, а затем чума распространилась на крупные города, в частности Хошимин, Далат, Камрань и Фантхьет. Во Вьетнаме вспышки чумы регистрировались с перерывами в 1898–2002 гг. [23]. Очаги Вьетнама являлись антропогенными. Сельские районы рядом с городами были местом, где существовала возможность заноса возбудителя блохами из популяции синантропных крыс диким млекопитающим [24]. Большая часть случаев чумы человека зарегистрирована в Южном Вьетнаме. В северных провинциях чума отмечена лишь с 1908 по 1922 год с изначальным обнаружением в Ханое в 1908 г. Особенностью чумы во Вьетнаме является проявление в виде спорадических случаев и кратковременных вспышек. Последние во Вьетнаме случаи чумы человека зарегистрированы в 1997–2002 гг. (472 случая). После 2003 г. заражения чумой не зафиксированы.

Таким образом, для стран Юго-Восточной Азии характерна общая схема заноса и распространения возбудителя чумы: в большинство стран штаммы занесены из Китая, затем происходили вспышки и эпидемии в городах с дальнейшим распространением по стране. Формирование природных очагов зависело от климатических условий и наличия природного резервуара (носители) и переносчиков. В странах Юго-Восточной Азии превалирует влажный и жаркий климат, поэтому численность блох, достаточная для распространения штаммов возбудителя чумы и формирования резервуара среди диких грызунов, возможна в горных районах, где уровень влажности ниже и не оказывает сильного пагубного влияния на блох и их личинки. В странах Юго-Восточной Азии, где штаммы возбудителя чумы не попали в горные районы, природные очаги не сформировались, и после улучшения санитарно-гигиенических условий в населенных пунктах, вакцинации и иных мер по борьбе с инфекцией чума была элиминирована.

Австралия. Первый случай чумы человека, о котором сообщалось в Австралии, отмечен 19 января 1900 г. в Сиднее. Случаи бубонной чумы регистрировались ежегодно в Сиднее, а также Северном Квинсленде, Мельбурне, Аделаиде и Фримантле до 1910 г. [25]. Всего зарегистрирован 1371 случай с 535 смертельными исходами по всей Австралии. В период с 1900 по 1925 год в Австралии было 12 крупных вспышек чумы, все они занесены морским путем. Несмотря на то, что чума занесена в Австралию, она не распространилась в природных биоценозах с формированием природных очагов с дикими грызунами в качестве резервуара. Случаи чумы регистрировались только в городах и были ассоциированы с городскими крысами. Вероятно, это связано со скоординированными профилактическими мероприятиями для предотвращения проникновения инфекции через порты вглубь страны, а также, возможно, с эндемичностью грызунов Австралии, которые не подошли в качестве природного резервуара чумы.

Северная Африка

Египет. В Египет завоз из Бомбея в Александрию произошел во время третьей пандемии в 1899 г. Во второй по величине порт страны Саид чума попала в 1900 г., в Суэц – в 1904 г. Как только были поражены основные порты, чума начала распространяться по суше вглубь страны, сначала заражая столицы провинций, а затем – сельскую местность. Таким образом, чума постепенно достигла большинства населенных пунктов долины Нила [26]. Как показывает статистика, собранная за период 1899–1930 гг., заболеваемость в Верхнем Египте была значительно выше, чем в портах Нижнего Египта. В 1938 г. в стране зарегистрировано всего 11 случаев. Во время Второй мировой войны ухудшился санитарно-гигиенический уровень в зоне Суэцкого канала, вследствие чего вспышки начались в Суэце, Исмаилии, ее округе и в Саиде. Последняя вспышка отмечена в Александрии, где заболело 15 человек с 5 смертельными исходами в январе 1947 г. С тех пор чума официально не регистрировалась в Египте, однако Н.Н. Mollaret в своей работе сообщил о сокрытии случаев чумы в Египте в 1984 г. во избежание изоляции и карантина [27].

Тунис. Согласно историческим данным, случаи заболевания человека чумой в Тунисе происходили в XVIII в., однако с 1822 г. не регистрировались в прибрежных районах Северной Африки к западу от Египта. Вновь чума появилась в порту Туниса в 1907 г., куда попала на корабле из Марселя [28]. За период 1926–1931 гг. описано 1095 случаев, в основном в городах Кайруан и Сфакс. В последующие годы заболеваемость чумой заметно снизилась. Однако в 1944–1945 гг. произошла вспышка бубонной чумы в Ферривиле (ныне Мензель-Бургиба), также случаи отмечались в городах Тунис и Бизерта. После этого случаи чумы на территории Туниса не регистрировались.

Ливия. В период с 1913 по 1920 год в Ливии произошли многочисленные вспышки чумы, самая крупная из которых зарегистрирована в 1917 г. в Бенгази, где от чумы умерли 1449 человек. Двенадцать подтвержденных случаев отмечены в 1939–1943 гг. в поселке рядом с Триполи [29]. Небольшие вспышки происходили с 1972 по 1984 год около Тобрука, недалеко от границы с Египтом. В 2009 г., после двадцати лет отсутствия, вновь зарегистрирована чума человека. Однако этиологическим агентом этой вспышки был штамм средневекового биовара, родственного штаммам из Средней Азии. Последняя вспышка произошла в Тобруке во время ливийской революции в мае 2011 г. [29].

Алжир. В Алжире чума впервые зарегистрирована в порту Филипвиль (ныне Скикда) в 1899 г. [28]. Периодически проявления чумы в Алжире происходили до 1911 г., но, скорее всего, они возникали из-за повторных завозов инфекции морскими или караванными путями, а не из-за формирования природных очагов. Вспышки наблюдались только дважды:

в 1921 г. в Омале и в 1931 г. в Константине. Всего за период 1935–1946 гг. описано 152 случая чумы человека [11]. После 50 лет отсутствия в Алжире вновь произошли две вспышки чумы: в 2003 г. в Ороне и в 2008 г. в небольшом лагере кочевников в районе Тайт-эль-Маа в провинции Лагуат. В этих вспышках пациентами стали люди из сельской местности, занимавшиеся разведением животных. М.А. Malek *et al.* показали, что штаммы возбудителя чумы восточного биовара на территории Алжира в настоящее время циркулируют среди мелких диких грызунов в природных очагах, расположенных в вилайетах Маскара, Лагуат, Мсила, Бискра и Иллизи [30].

Марокко. В Марокко чума впервые появилась в 1909–1910 гг., когда, согласно R. Jorge, зарегистрировано 25 случаев в районе Касабланки. Массовая эпидемия произошла в 1911 г. в области Дуккалла-Абда [28]. В 1912–1919 гг. вспышки продолжались в этой области, впоследствии инфекция достигла портов Касабланка и Рабат. В дальнейшем небольшие вспышки происходили в периоды 1922–1924 и 1929–1935 гг. Однако в 1940–1945 гг. число случаев чумы значительно увеличилось. Еще одна крупная вспышка чумы произошла в 1977 г. [31].

Таким образом, на территорию стран Западной Африки штаммы восточного биовара занесены преимущественно морским путем во время третьей пандемии из Индии и стран Европы независимыми путями. В течение десятилетий в Западной Африке наблюдались вспышки чумы человека, сначала в портовых городах, а затем в сельской местности, что могло привести к формированию природных очагов. В период Второй мировой войны для большинства стран Северной Африки было характерно увеличение числа случаев чумы человека, что связано с ухудшением санитарно-гигиенического контроля. Однако на территории Египта, Туниса и Марокко не произошло формирование природных очагов чумы (нет случаев чумы человека более 70 лет) либо циркуляция происходит в крайне ограниченных и ненаселенных районах. В Ливии последние вспышки вызваны штаммами средневекового биовара, что говорит о наличии активных природных очагов чумы и указывает на возможность элиминации штаммов восточного биовара с ее территории. В Алжире произошло формирование природных очагов чумы, где циркулируют штаммы восточного биовара в вилайетах Маскара, Лагуат, Мсила, Бискра и Иллизи. В этих вилайетах засушливый климат, расположены горы Атлас, основное занятие населения – сельское хозяйство и животноводство. Вероятно, природные очаги сформировались именно в этих вилайетах в связи с ландшафтно-климатическими особенностями и социокультурными факторами.

Западная Африка. Сенегал. На территорию Сенегала штаммы чумы восточного биовара занесены на корабле из Касабланки в апреле 1914 г. [28]. Первоначально было отмечено множество случаев чумы легочной формы в Дакаре. Эпидемия продол-

жалась до января 1915 г., охватила также острова Кабо-Верде (ныне Республика Кабо-Верде) и унесла жизни почти 9 тыс. человек. Дальнейшие проявления чумы были ограничены Западным Сенегалом с городами Дакар и Сент-Луис. После Второй мировой войны о регистрации чумы в Сенегале не сообщалось.

Центральная Африка. Для природных очагов чумы в Центральной Африке характерна циркуляция штаммов античного биовара (1.ANT). Однако в литературе встречаются данные о завозе чумы из Индии во время строительства Угандской железной дороги с 1896 по 1901 год. В результате в период 1903–1908 гг. чума человека была во многих портах на озере Виктория [32]. Возможно, эти случаи вызваны штаммами восточного биовара. Однако, по всей видимости, штаммы восточного биовара не смогли укорениться на территории стран Центральной Африки.

Южная Африка. Чума появилась в Южно-Африканской Республике (ЮАР) в 1900 г., когда из-за Второй англо-бурской войны пришлось импортировать большое количество корма из пораженных чумой южноамериканских портов. В период с 1900 по 1902 год в Кейптауне произошли серьезные эпидемии, распространившиеся на Порт-Элизабет, Ист-Лондон и другие порты на южном побережье страны в Восточной Капской провинции, а также в Дурбане и Питермарицбурге на восточном побережье в провинции Квазулу-Натал. Позднее, в 1903–1904 гг., регистрировались вспышки в городах, расположенных дальше от побережья: Кинг-Уильямс-Тауне, Квинстауне и Йоханнесбурге. С 1914 г. вспышки отмечались в отдаленных сельских районах, сначала в Восточной Капской провинции, а позднее в провинции Фри-Стейт и потом в Трансваале (ныне территории провинций Мпумаланга, Лимпопо и Гаутенг). В результате сформировались три основных очага чумы, расположенные в юго-западном Трансваале, северо-западном штате Оранжево-Фри и в районе около Порт-Элизабет [33]. В итоге от распространения инфекции из этих очагов пострадало более половины Южной Африки. В 1919–1931 гг. произошла иррадиация чумы в Карру (засушливый регион на юге Африки) и северную часть провинции Фри-Стейт, а также на территорию современных Намибии и Ботсваны. В период 1931–1949 гг. заболеваемость чумой держалась на уровне около 100 случаев в год в энзоотических районах северной части провинции Фри-Стейт и Восточной Капской провинции [33]. В последние десятилетия в ЮАР не отмечалось случаев чумы человека.

В итоге штаммы восточного биовара линии 1.ORI2 были занесены во многие страны Африки с территории Индии, Европы, Южной Америки, однако формирование активных природных очагов со штаммами этой линии эволюции *Y. pestis* в странах Западной, Центральной и Южной Африки не произошло. Хотя в ЮАР есть области с сухим климатом,

подходящим для развития личинок блох и реализации эпизоотического процесса, в последние десятилетия там не наблюдается активных природных очагов. Страны Западной и Центральной Африки характеризуются влажным климатом, который, возможно, препятствует развитию большого количества блох и протеканию разлитых эпизоотий. Природные очаги чумы со штаммами линии 1.ORI2 находятся на территории Северной Африки (Алжир) на границе сельскохозяйственных территорий и пустыни Сахары, где влажность не слишком высока, но есть значительное число диких грызунов, выполняющих роль природного резервуара.

Южная Америка. Впервые чума зарегистрирована в Латинской Америке в Уругвае в 1899 г. с прибытием в Монтевидео корабля из Роттердама с партией риса из Индии. В Монтевидео груз был передан на аргентинский пароход, который проследовал в порт Буэнос-Айрес, затем Ла-Плата, чтобы, наконец, прибыть в Асунсьон (Парагвай). С 1899 по 1913 год вспышки чумы произошли в нескольких аргентинских городах: Тукуман (1900), Кордова (1907) и Баия Бланка (1913). Первая известная эпидемия чумы в Монтевидео возникла в июне 1901 г., считается, что она связана с прибытием корабля, который ранее отправился из порта Росарио (Аргентина) в Лондон и Антверпен. Впоследствии болезнь распространилась из Монтевидео в Асунсьон [34]. В 1899 г. болезнь достигла Сантоса (Сан-Паулу, Бразилия) на судах из Рангуна (Бирма), минуя Порто (Португалия). После этого в январе 1900 г. произошла вспышка с распространением на северо-восток Бразилии, на территорию устья Амазонки. На тихоокеанское побережье Южной Америки чума попала через порт Кальяо (Перу) в декабре 1902 г. с прибытием корабля из Бангкока. После этого возбудитель чумы был занесен в другие прибрежные города, такие как Лима, и вглубь страны. В Эквадор возбудитель чумы попал в феврале 1908 г. с кораблями из Пайта (Пьюра, Перу), вызвав вспышку в Гуаякиле и Санта-Розе. В Чили заболевание впервые зарегистрировано на севере, в порту Икике, и впоследствии в Вальпараисо в 1903 г., после прибытия кораблей из Кальяо. Из-за изоляции и удаленности от побережья на территории Боливии не отмечалось случаев чумы человека до 1921 г. Считается, что в 1908 г. корабль из Гуаякиля занес чуму в Ла-Гуайра (штат Варгас, Венесуэла). На территории Колумбии и Гайаны не зарегистрировано случаев чумы человека [34].

Регистрация заболеваемости чумой продолжалась более 50 лет в шести странах: Аргентине, Венесуэле, Боливии, Бразилии, Эквадоре и Перу. В итоге эндемичными по чуме стали Боливия, Бразилия, Эквадор и Перу.

Бразилия. Первоначально чума попала в порт Сантос, Сан-Паулу, в 1899 г. из Бирмы. В течение следующих семи лет произошли вспышки чумы в портах Сеара и Рио-де-Жанейро, Пернамбуку и Рио-Грандо-ду-Сул, Пара, Баия, Эспириту-Санту,

Парана и Сержипе. К 1930 г. чума перешла в сельские районы и укоренилась в энзоотических очагах, поражая грызунов. Первые доказательства формирования природных очагов *Y. pestis* на территории Бразилии представлены в период с 1966 по 1982 год, когда были выделены штаммы возбудителя чумы из грызунов. В период 1899–1929 гг. средняя заболеваемость составляла 188 больных в год; в период 1929–1980 гг. – 20–100 больных в год. В период 1968–1978 гг. в Бразилии зарегистрировано больше всех случаев чумы человека среди стран Северной и Южной Америки – 2031. После этого заболеваемость чумой резко пошла на спад: только три зарегистрированных случая в 1990-е гг. и один случай в штате Сеара в 2005 г. [35]. Согласно данным полногеномного SNP-анализа большого числа штаммов *Y. pestis* из Бразилии, полученным A.J. Vogler *et al.*, очаги чумы в Бразилии являются результатом единичного заноса во время третьей пандемии чумы. После этого заноса произошло радиальное распространение патогена с формированием нескольких природных очагов на территории Бразильского плоскогорья [36].

Перу. Чума попала в Перу на корабле из Бангкока в порты Писко и Кальяо в 1902 г. и распространилась в столице Лиме с формированием антропоургического очага. Через несколько лет возбудитель распространился вглубь страны в сельские районы с формированием энзоотических очагов. По данным Министерства здравоохранения Перу, в период с 1903 по 1964 год зарегистрировано 23166 случаев чумы человека (летальность 45 %) в 12 регионах. За период 1965–1992 гг. зарегистрированы спорадические вспышки в сельских районах четырех регионов на северо-западе страны (Пьюра, Ламбаек, Кахамарка и Ла-Либертад) [37]. С 2000 по 2010 год зарегистрировано 107 подтвержденных случаев чумы человека на территории Перу, в основном на территории четырех регионов на северо-западе Перу. В 2011 г. зафиксирован только один подтвержденный случай бубонной чумы в г. Картавио, район Сантьяго-де-Као, регион Либертад. Последний зарегистрированный случай чумы человека в Перу – в регионе Ламбаек в июле 2018 г.

Эквадор. Основной гипотезой заноса чумы на территорию Эквадора считается занос с кораблями из Перу в Гуаякиль. Однако существуют еще две гипотезы на этот счет: занос кораблями из порта Антофагаста (Чили) или из Индии [38]. Из Гуаякиля чума распространялась по рекам и с помощью железнодорожного транспорта (Гуаякиль-Кито). Больше всего заболевших было в провинциях Гуаяс, Манаби, Оро, Чимборасо, Тунгурауа, Лойа и Котопакси. За период 1908–1965 гг. отмечено 14406 заболевших и 5500 смертей. Последние смертельные случаи чумы при бубонной форме в Эквадоре зарегистрированы в 2004 г. в провинции Чимборасо в результате потребления зараженных морских свинок [39]. Обращает на себя внимание, что наибольшее число случаев чумы человека происходило в провинциях, располо-

женных или граничащих с Андами, где преобладают горные степи.

Боливия. Вследствие удаленности от побережья Боливия стала последней южноамериканской страной, куда распространилась чума. Первый случай зарегистрирован в 1921 г. в г. Падкайя (провинция Арсе), куда чума занесена из аргентинской провинции Жужуя. Жертвами эпидемии в провинции Арсе в 1922 г. стали около 300 человек [40]. В 1928 г. чума достигла провинции Вальегранде в Аргентине. Четыре года спустя во время Чакской войны чума поразила г. Хуайрахауаси-Гранде провинции Томина. Эпидемия длилась около восьми месяцев [40]. До 1955 г. отмечались многочисленные вспышки болезни с предшествовавшими им эпизоотиями в разных регионах департаментов Тариха, Чукисака и Санта-Крус. В 1960 г. болезнь впервые зарегистрирована в департаменте Ла-Пас. В последние годы случаи чумы человека в Боливии регистрируются редко; так, единичный случай был в 2010 г. в муниципалитете Аполо. В 2014 г. сообщалось о нескольких случаях бубонной чумы в общинах у границы с Перу в департаменте Ла-Пас. Последний случай зарегистрирован в апреле 2018 г. в муниципалитете Аполо. В результате природные очаги в Боливии сформировались на территории департаментов Тариха, Чукисака, Санта-Крус и Ла-Пас, рядом с которыми протекают Анды, в департаменте Санта-Крус расположены Сухие леса Чикитано – неотропический экорегион сухих тропических широколиственных лесов, – характеризующиеся продолжительным бездождливым периодом с сильными засухами.

Венесуэла. Начиная с 1903 г. Венесуэла проводила санитарно-карантинные мероприятия в отношении любого корабля, прибывающего из эпидемической зоны. Эти меры ослабили при политическом кризисе в 1905 г., и результатом стала первая эпидемия чумы в 1908 г. в г. Ла-Гуайра (штат Варгас), куда чума попала с кораблями из Гуаякиля (Эквадор) или Порт-оф-Спейн (Тринидад и Тобаго) [41]. В 1908–1909 гг. чума быстро распространилась по г. Каракасу (штат Миранда), где случаи чумы регистрировались до 1919 г. Наконец, с 1950 по 1962 год выявлено 23 случая чумы человека. Последний случай зарегистрирован в Венесуэле в 1962 г.

Чили. Первый случай заражения чумой в Чили произошел в г. Икика в 1903 г. К концу сентября зарегистрировано 214 случаев чумы человека со смертностью 64 % [42]. К концу 1903 г. чума занесена в г. Вальпараисо. В период 1907–1916 гг. случаи чумы зарегистрированы в городах Дель Рио, Арика, Винья-дель-Мар, Сантьяго. Последний известный случай чумы человека в Чили отмечен в 1941 г.

Колумбия. Отсутствуют официально описанные случаи чумы человека на территории Колумбии. Однако есть исторические упоминания о серии случаев «инфекционной пневмонии» с высокой смертностью, которые произошли в 1913–1916 гг. в департаментах Магдалена, Атлантико-и-Боливар,

расположенных на колумбийском атлантическом побережье [43]. На основании этого Высший совет здравоохранения Колумбии признал эти случаи пневмонии чумой. Однако потом отказались от этого вывода. Отсутствие эпизоотий среди грызунов и описание только пневмоний во время вспышек, подозрительных на чуму, в Колумбии вызывают сомнения в том, что люди действительно болели чумой.

Аргентина. Из Асунсьона чума была занесена в Росарио и другие речные порты Аргентины, а также в Буэнос-Айрес, а оттуда в отдаленные районы, где в результате сформировались природные очаги среди диких грызунов на широкой территории, простирающейся от северных провинций Жужуй и Сальта на границе с Боливией до границы с Патагонией на юге [11]. В своей работе J.M. de la Barrera [44] разделил природные очаги чумы Аргентины на две группы: а) в центральной части страны в провинциях Рио-Негро, Ла-Пампа, Мендоса и Сан-Хуан (на тот период они характеризовались невысокой плотностью населения и неразвитым сельским хозяйством, что обусловило низкий уровень заболеваемости людей); б) находящиеся в северной части страны в провинциях Сантьяго-дель-Эстero, Тукуман и Сальта, в которых развито сельское хозяйство, что привлекло грызунов в населенные пункты и дома и обусловило высокую заболеваемость людей. Число случаев чумы в Аргентине с 1899 по 1930 год составило примерно 6200, в 1931–1949 гг. – 749 случаев.

В связи с большой площадью природных очагов и вовлеченностью преимущественно сельских районов заболеваемость чумой в Аргентине была довольно низкой, случаи чумы человека обычно не сгруппированы, а проявлялись независимо друг от друга. Последний случай чумы человека в Аргентине зарегистрирован в 1958 г.

Другие страны Южной Америки. История распространения чумы в Уругвае и Парагвае изучена мало. Первый и последний случаи чумы зарегистрированы в Уругвае в 1900 и 1931 гг., в Парагвае – в 1899 и 1928 гг.

Таким образом, во время третьей пандемии чумы в страны Южной Америки занесены штаммы восточного биовара линии 1.ORI2 морским путем с территории Индии и Европы. Первоначально были поражены портовые города, после чего штаммы распространились в природные биотопы. В результате активные природные очаги сформировались на территории стран Южной Америки, где расположены плоскогорья и Анды.

Ближний Восток. Случаи чумы и ограниченные эпидемии встречались в Палестине в конце Первой мировой войны, однако болезнь не регистрировалась в период 1925–1940 гг. После этого чума вновь появилась в Хайфе в 1941 и 1947 гг., предположительно, в результате заноса из зоны Суэцкого канала [45]. В дальнейшем случаи чумы не регистрировались, что говорит об отсутствии активных природных очагов в Израиле.

Европа. В период между 1899 и 1947 гг. зарегистрировано 1692 случая и 457 смертей от чумы в Европе. Случаи географически широко распространены в основном в прибрежных портовых городах. Чума зарегистрирована в 11 странах. В странах Северной и Восточной Европы не регистрировалось ни одного случая чумы за время третьей пандемии. Чума много раз завозилась в европейские порты на протяжении третьей пандемии на судах, прибывающих из-за границы, часто из городов бывших европейских колоний, таких как Бомбей, Буэнос-Айрес и Александрия. После 1950 г. чума в Европе не регистрировалась [46].

Франция и Италия. Вскоре после окончания Второй мировой войны отмечены вспышки в городах Аяччо (Франция) и Таранто (Италия), куда, согласно литературным данным, возбудитель чумы предположительно попал морским путем из Северной Африки.

Мальта. Чума появилась на Мальте в 1917 г. Согласно данным литературы, занос произошел с территории Месопотамии [47]. Вспышка в 1936 г. обусловлена завозом из Северной Африки. Упоминание Месопотамии и Северной Африки в качестве источника заноса возбудителя чумы на Мальту, а также дата первой вспышки на Мальте дают основание предположить возможность того, что штаммы восточного биовара являлись этиологическими агентами этих вспышек.

Португалия. Первая вспышка чумы зарегистрирована в 1908 г. на нескольких Азорских островах. Также вспышки были на острове Сан-Мигель в 1922–1923 гг. Однако после этого регистрировались лишь отдельные случаи в сельской местности со средним количеством заболевших – 8 в год в течение периода 1942–1948 гг. [11].

Штаммы восточного биовара линии 1.ORI2 в страны Европы занесены морским путем из Индии и других бывших колоний, вызвав вспышки в торговых городах. Однако после 1950 г. не отмечено случаев чумы человека и эпизоотий среди грызунов, что говорит о том, что штаммы линии 1.ORI2 не смогли укорениться с формированием природных очагов.

Таким образом, линия 1.ORI2 берет свое начало на территории Китая и западной части Индии (радиация 1.ORI2a), откуда была разнесена преимущественно морским путем по большинству континентов (рис. 2). Так, на территорию Южной Америки занесены штаммы 1.ORI2v и 1.ORI2viii, в Европу – 1.ORI2vi и 1.ORI2viii, в страны Северной Африки – 1.ORI2iii, в Центральную и Южную Африку – 1.ORI2iv и 1.ORI2vii, в Юго-Восточную Азию – 1.ORI2ii и 1.ORI2ix. В результате заносов природные очаги чумы с дикими грызунами в качестве резервуаров сформировались в Юго-Восточной Азии, Африке, Южной Америке. В Европе случаи чумы не регистрировались с 1950 г., возможно, штаммы возбудителя чумы не закрепились в природных биото-

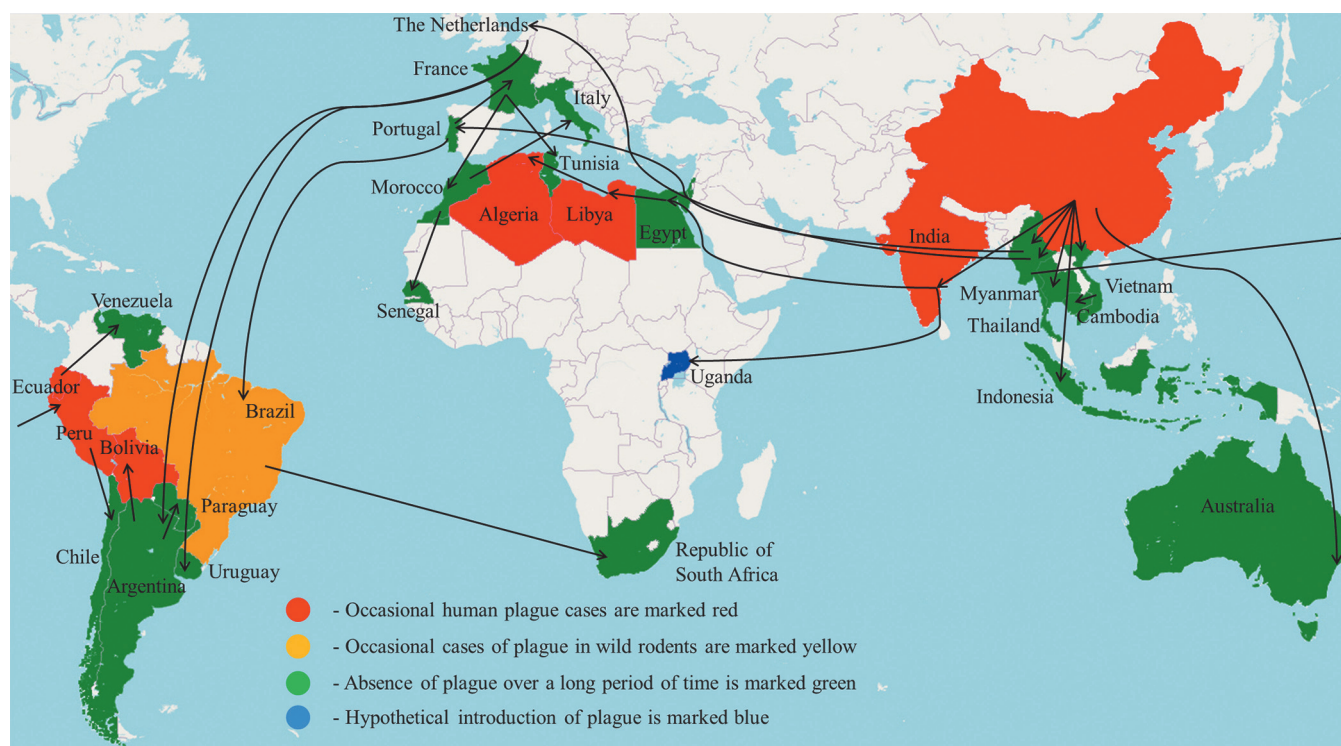


Рис. 2. Схема распространения штаммов 1.ORI2. Для рисунка использована карта с сайта OpenStreetMap (www.openstreetmap.org/ copyright):

красный цвет – периодические случаи чумы человека; желтый – периодические случаи чумы диких грызунов; зеленый – отсутствие чумы долгое время; синий – гипотетический занос чумы

Fig. 2. Scheme of distribution of 1.ORI2 strains. The map used for the figure is from the OpenStreetMap website (www.openstreetmap.org/ copyright)

пах. Кроме того, был занос штаммов линии 1.ORI2 на территорию Австралии, однако там природные очаги не сформировались.

Линия 1.ORI3

Линия 1.ORI3 берет свое начало с территории Индии, откуда занесена на Мадагаскар и в Турцию. Наибольшее распространение линия 1.ORI3 получила на Мадагаскаре, сформировав природные очаги в центральном нагорье (рис. 3).

Мадагаскар. Ветвь 1.ORI3 распространилась по о. Мадагаскар, попав туда из Индии в 1898 г. [8]. Впервые возбудитель чумы занесен в г. Туамасина. К 1921 г. чума достигла Антананариву, вероятно, по железной дороге. Природные очаги чумы в основном локализованы в центральной и северной частях, в местностях выше 800 м над уровнем моря (это связано с отсутствием основных переносчиков – блох *Xenopsylla cheopis* и *Synopsyllus fonquerniei* – в биотопах ниже этого уровня). Кроме того, описан природный очаг близ портового города Махадзанга, в 400 км от Антананариву [48]. В период 1937–1941 гг. заболеваемость снизилась до уровня менее 300 случаев в год, что связано с проведением начатой в ноябре 1935 г. крупномасштабной кампании по вакцинации живой вакциной Жирара и Робика. В 1991 и 1995–1999 гг. вновь зарегистрированы случаи заболевания

людей в этом регионе [49]. С помощью молекулярно-генетических методов определено, что штаммы, вызвавшие эти вспышки, занесены туда с территории центральной горной местности. Таким образом, установлено исчезновение возбудителя чумы из природного биотопа в районе Махадзанга [48]. Согласно данным молекулярно-генетического анализа, штаммы из Мадагаскара линии 1.ORI3 являются потомками линии 1.ORI2 и делятся на два кластера: 1.ORI3.k и 1.ORI3.d. Кластер 1.ORI3.k представлен штаммами, циркулирующими на территории центрального высокогорья и в прибрежных районах с 1926 г. и по сей день. Кластер 1.ORI3.d сформирован штаммами, циркулирующими на ограниченной территории высокогорья близ Фианаранцуа с 1939 г. по настоящее время [8, 48, 50].

Последняя разлитая вспышка чумы на Мадагаскаре была в 2017 г., когда заразились 2417 человек, из которых 209 умерли. А последние зарегистрированные случаи чумы человека на Мадагаскаре зафиксированы в августе 2019 г., когда заболели три человека.

Турция. В Турции вспышка чумы в трех деревнях на сирийской границе произошла в марте – апреле 1947 г. После этого заноса штаммов линии 1.ORI3 случаев чумы человека и эпизоотий среди диких грызунов не отмечено, что свидетельствует об отсутствии природных очагов на территории Турции.

Итак, штаммы восточного биовара, являющиеся этиологическим агентом третьей пандемии чумы, получили чрезвычайно широкое распространение по всему миру в результате заносов преимущественно морским путем, благодаря развитому сообщению между странами. Свое начало восточный биовар (1.ORI) берет с территории Китая, затем штаммы иррадиировали в другие страны на большинстве континентов. Штаммы восточного биовара делятся на три основных линии эволюции: 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3. Линии 1.ORI1 и 1.ORI2 образовались в Китае, после чего 1.ORI1 и 1.ORI2 распространились на восточное и западное побережье Индии соответственно. Затем линия 1.ORI1 была занесена в Северную Америку, где сформировались природные очаги на территории США (регулярно регистрируются случаи чумы человека) и Канады (периодически обнаруживаются больные грызуны). Линия 1.ORI2 получила распространение в Юго-Восточной Азии (заболевания регистрировались в Индонезии, Мьянме, Вьетнаме, Камбодже и Таиланде, природные очаги образовались в Индонезии и Вьетнаме), Африке (заболевания чумой, вызванные штаммами линии 1.ORI2, имели место по всему континенту, однако, кроме Алжира и Ливии, штаммы восточного биовара не выделялись в странах Африки после 1948 г.), Европе (случаи чумы не регистрировались после 1950 г.) и Южной Америке (были заражены почти все страны, природные очаги сформировались в Бразилии, Перу, Эквадоре, Аргентине, Венесуэле). Также штаммы восточного биовара завезены на тер-

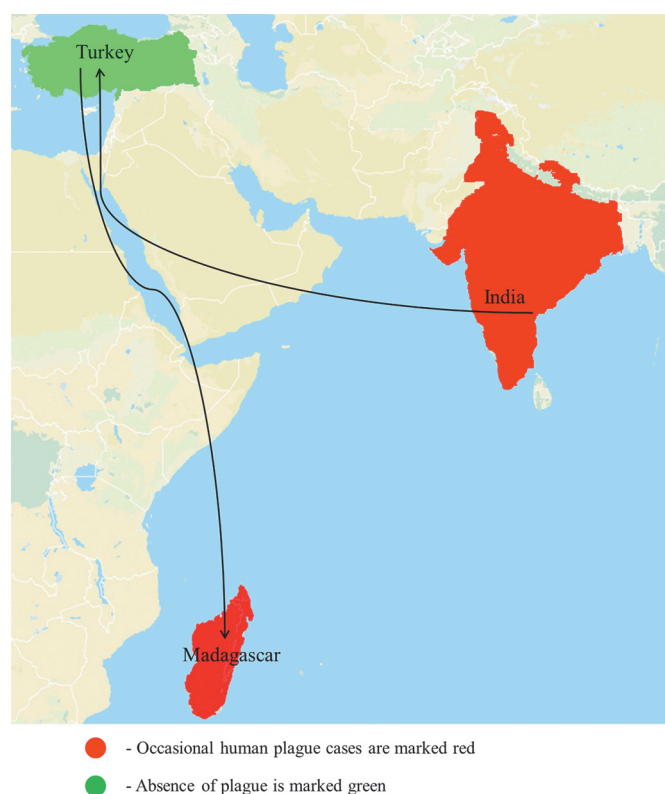


Рис. 3. Распространение штаммов линии 1.ORI3. Для рисунка использована карта с сайта OpenStreetMap (www.openstreetmap.org/copyright):

красный цвет – периодические случаи чумы человека, зеленый – отсутствие чумы

Fig. 3. Scheme of distribution of 1.ORI3 strains. The map used for the figure is from the OpenStreetMap website (www.openstreetmap.org/copyright)

риторию Австралии, но природные очаги не сформировались, и после 1925 г. она свободна от чумы.

Согласно данным литературы, занос штаммов восточного биовара на новые территории во время третьей пандемии происходил с участием чаще всего одного штамма, который вызывал эпизоотии среди синантропных грызунов (возможно, штаммы восточного биовара имеют сродство к крысам, играющим роль основного резервуара и переносчика, что объясняет широкое распространение штаммов морским путем с корабельными крысами и формирование в первую очередь очагов в портах). Затем развивались вспышки среди населения портовых городов с последующим заносом на сельскохозяйственные территории и формированием природных очагов с дикими грызунами в качестве резервуара при подходящих природных условиях. При отсутствии таковых (например, высокая влажность приводит к снижению выживаемости личинок блох, и, как следствие, уменьшается число переносчиков патогена) возбудителю чумы не удавалось закрепиться в природных биотопах, он элиминировался. Доказательством этой гипотезы служит формирование активных очагов чумы со штаммами восточного биовара в степных и полупустынных регионах; в странах с тропическим климатом активные природные очаги сформировались только в горных регионах, где средняя влажность ниже. Эта схема имеет молекулярно-генетическое подтверждение: филогенетический анализ показал, что распространение вызвано единичными штаммами, которые при заносе на новые территории приспособлялись и формировали множество новых штаммов, формирующих генетический кластер с малой вариабельностью внутри [36, 48].

Довольно долгое время в литературе высказывались теории о зависимости активности природных очагов чумы от климата. L. Rogers предположил, что сезонные колебания температуры и влажности ответственны за сезонные колебания частоты случаев чумы человека в Индии [51]. Спустя десятилетия D.H. Davis показал, что случаи чумы человека в африканских странах отмечались реже, когда погода была слишком жаркой или холодной [52]. Последующие исследования показали увеличение заболеваемости чумой во Вьетнаме во время жаркого, сухого сезона. Кроме изменения численности переносчика инфекции, климатические условия влияют на численность и миграционную активность резервуара чумы – грызунов. Таким образом, климатические условия воздействуют на все звенья эпизоотического процесса, активность природного очага чумы и саму возможность его формирования в конкретных ландшафтно-климатических регионах [53].

В последние годы показано, что возбудитель чумы вступает во взаимодействие с почвенной микробиотой, формируя биопленку и выживая внутри представителей почвенного биоценоза. *Y. pestis* взаимодействует с амебами и может размножаться

в них [54]. В литературе имеются сообщения по изучению взаимодействия возбудителя чумы и амеб *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, *Dictyostelium* [55, 56], а также отдельные сообщения, предполагающие возможность сохранения возбудителя чумы в других массовых членах почвенных биоценозов, например в почвенных нематодах [57, 58]. На основании этих фактов можно предположить, что в стабильных климатических условиях возбудитель чумы не будет покидать свой природный почвенный резервуар, и, как следствие, проявление активности природного очага менее вероятно. Эта теория объясняет отсутствие активных природных очагов чумы в биотопах тропического, средиземноморского и других стабильных по влажности и температуре климатов и, наоборот, наличие активных природных очагов чумы в биотопах степного, полупустынного климата, горных регионов, для которых характерны циклические и резкие изменения влажности и температуры, влекущие за собой изменения соотношения численности представителей почвенной биоты и выход возбудителя чумы из биопленок и амеб, приводящий к началу эпизоотического процесса.

Для более полного выяснения подробностей распространения штаммов восточного биовара не хватает как исторических данных, так и штаммов – предков современных штаммов на территории многих стран. В результате представления о распространении многих ветвей эволюции штаммов восточного биовара имеют вид гипотез.

Таким образом, требуется дальнейшее исследование штаммов восточного биовара, которое позволит выявить новые факты о возникновении, распространении и популяционной структуре восточного биовара основного подвида *Y. pestis*.

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

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
2. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999; 96(24):14043–8. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14043.
3. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.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.
4. Bos K.I., Schuenemann V.J., Golding G.B., Burbano H.A., Waglechner N., Coombes B.K., McPhee J.B., DeWitte S.N., Meyer M., Schmides S., Wood J., Earn D.J., Herring D.A., Bauer P., Poinar H.N., Krause J. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black death. *Nature*. 2011; 478:506–10. DOI: 10.1038/nature10549.
5. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Waglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsell D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., DeWitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14(4):319–26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.
6. Drancourt M., Signoli M., Dang L.V., Bizot B., Roux V., Tzortzis S., Raoult D. *Yersinia pestis* Orientalis in remains of an-

- cient plague patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(2):332–3. DOI: 10.3201/eid1302.060197.
7. Spyrou M.A., Keller M., Tikhbatova R.I., Scheib C.L., Nelson E.A., Andrade Valtueña A., Neumann G.U., Walker D., Alterauge A., Carty N., Cessford C., Fetz H., Gourvenec M., Hartle R., Henderson M., von Heyking K., Inskip S.A., Kacki S., Key F.M., Knox E.L., Later C., Maheshwari-Aplin P., Peters J., Robb J.E., Schreiber J., Kivisild T., Castex D., Löscher S., Harbeck M., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Phylogeography of the second plague pandemic revealed through analysis of historical *Yersinia pestis* genomes. *Nat. Commun.* 2019; 10(1):4470. DOI: 10.1038/s41467-019-12154-0.
8. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3. DOI: 10.1038/ng.705.
9. Spyrou M.A., Tikhbatova R.I., Feldman M., Drath J., Kacki S., Beltrán de Heredia J., Arnold S., Sidiqov A.G., Castex D., Wahl J., Gazimzyanov I.R., Nurgaliyev D.K., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Historical *Y. pestis* genomes reveal the European black death as the source of ancient and modern plague pandemics. *Cell Host Microbe.* 2016; 19(6):874–81. DOI: 10.1016/j.chom.2016.05.012.
10. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
11. 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.
12. Никифоров К.А., Куклева Л.М., Альхова Ж.В., Оглодин Е.Г., Макашова М.А., Нарышкин Е.А., Гусева Н.П., Ерошенко Г.А., Dang Hong Chien, Lyong Thi Mo, Vo Viet Kyong, Кутырев В.В. Филогения и историко-географический анализ штаммов *Yersinia pestis* из Вьетнама. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; 2:98–107. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-98-107.
13. WHO Africa. – Plague outbreak situation reports [Электронный ресурс]. URL: <https://www.afro.who.int/health-topics/plague/plague-outbreak-situation-reports> (дата обращения 14.12.2017).
14. Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Иванов А.В., Оглодин Е.Г., Никифоров К.А., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Чипанин Е.В., Аязбаев Т.З., Джапарова А.К., Бердиев С.К., Лопатин А.А., Дубянский В.М., Щербакова С.А., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпидемиологическая ситуация по чуме в 2020 г. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации и других стран СНГ на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; 1:52–62. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-52-62.
15. Wu Lien-teh, Chun J.W.H., Pollitzer R., Wu C.Y. Plague: a manual for medical and public health workers. Shanghai; 1936.
16. Арутюнов Ю.И., Пичурина Н.Л., Судьина Л.В., Трухачев А.Л. Чума в Китае: эпидемиологические и эпизоотологические аспекты. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2019; 8(3):70–7. DOI: 10.24411/2305-3496-2019-13011.
17. Sharif M. Spread of plague in the southern and central divisions of Bombay Province and plague endemic centres in the Indo-Pakistan Subcontinent. *Bull. World Health Organ.* 1951; 4(1):75–109.
18. Gill C.A. The Genesis of Epidemics and the Natural History of Disease: an Introduction to the Science of Epidemiology Based upon the Study of Epidemics of Malaria, Influenza, and Plague. London; 1928.
19. Mahale K.N., Paranjape P.S., Marathe N.P., Dhotre D.P., Chowdhury S., Shetty S.A., Sharma A., Sharma K., Tuteja U., Batra H.V., Shouche Y.S. Draft genome sequences of *Yersinia pestis* strains from the 1994 plague epidemic of Surat and 2002 Shimla outbreak in India. *Indian J. Microbiol.* 2014; 54(4):480–2. DOI: 10.1007/s12088-014-0475-7.
20. Gibbons R.J. Survey of Rocky Mountain spotted fever and sylvatic plague in western Canada during 1938. *Can. Public Health J.* 1939; 30:184.
21. Kaul P.M. *Epidem. Vital Statist. Rep.* 1949; 2:142.
22. Williams J.E., Hudson B.W., Turner R.W., Saroso J.S., Cavanaugh D.C. Plague in Central Java, Indonesia. *Bull. World Health Organ.* 1980; 58(3):459–65.
23. Касьян А.Ф., Дао Сунан Винь, Бобров А.Г. Характеристика некоторых биологических свойств штаммов возбудителя чумы, циркулирующих во Вьетнаме. В кн.: Экологические и эпизоотологические аспекты чумы во Вьетнаме. М.; Хошимин-Буонматхуот; 2003. С. 96–8.
24. Сунцов В.В., Сунцова Н.И., Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Данг Туан Дат, Лыонг Тхи Мо, Слудский А.А., Куклев Е.В., Тарасов М.А., Касьян И.А., Майоров Н.В., Астахова Т.С. Антропоургические очаги чумы Вьетнама: прошлое и настоящее. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2014; 4:29–35. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-29-35.
25. Baxter-Tyrie C.C. Report of an outbreak of plague in Queensland during the first six months of 1904. *J. Hyg. (Lond.).* 1905; 5(3):311–32. DOI: 10.1017/s0022172400002588.
26. Hussein A.G. Changes in the epidemiology of plague in Egypt, 1899–1951. *Bull. World Health Organ.* 1955; 13(1):27–48.
27. Mollaret H.H. [Concealing and denying the plague]. (In French) *Hist. Sci. Med.* 1995; 29(4):343–5.
28. Jorge R. La peste africaine, Paris. *Bull. Off. Int. Hyg. Publ.* 1935; 27(9):11–3.
29. Malek M.A., Bitam I., Drancourt M. Plague in Arab Maghreb, 1940–2015: a review. *Front. Public Health.* 2016; 4:112. DOI: 10.3389/fpubh.2016.00112.
30. Malek M.A., Hammani A., Beneldjouzi A., Bitam I. Enzootic plague foci, Algeria. *New Microbes New Infect.* 2014; 4:13–6. DOI: 10.1016/j.nmni.2014.11.003.
31. Benedictow O.J. Morbidity in historical plague epidemics. *Popul. Stud. (Camb.)* 1987; 41(3):401–31. DOI: 10.1080/0032472031000142976.
32. Hopkins G.H.E. Report on Rats, Fleas and Plague in Uganda. Entebbe; 1949. P. 15–8.
33. Davis D.H.S. Plague. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 1948; 42:207.
34. Faccini-Martínez Á.A., Sotomayor H.A. Historical review of the plague in South America: a little-known disease in Colombia. *Biomedica.* 2013; 33(1):8–27. DOI: 10.1590/S0120-41572013000100002.
35. Tavares C., Aragão A.I., Leal N.C., Leal-Balbino T.C., de Oliveira M.B., de Oliveira Gonçalves Ferreira G.M., de Almeida A.M. Plague in Brazil: from now and then. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954:69–77. DOI: 10.1007/978-1-4614-3561-7_10.
36. Vogler A.J., Sahl J.W., Leal N.C., Sobreira M., Williamson C.H.D., Bollig M.C., Birdsell D.N., Rivera A., Thompson B., Nottingham R., Rezende A.M., Keim P., Almeida A.M.P., Wagner D.M. A single introduction of *Yersinia pestis* to Brazil during the 3rd plague pandemic. *PLoS One.* 2019; 14(1):e0209478. DOI: 10.1371/journal.pone.0209478.
37. Laguna-Torres A., Gómez-Benavides J. La peste en el Perú. *Rev. Peru. Med. Trop.* 2004; 9(1):89–98.
38. Palacios M., Estévez E. La peste en el Ecuador, sus inicios y control. *Rev. Ecuat. Hig. Med. Trop.* 2006; 43:43–50.
39. Vega R. Peste bubónica en Ecuador. *Situación Epidemiológica Internacional.* 2004; 31:3.
40. Padilla M. La peste bubónica en Chuquisaca. *Rev. Inst. Med. Su.* 2007; 73:1–7.
41. Fagúndez M.A. El impacto de la peste bubónica en la ciudad de Caracas. 1908–1909. *Ensayos Históricos.* 2007; 19:167–79.
42. Cabrera J. La epidemia de peste bubónica en Iquique, 1903: un acercamiento global. *Pensamiento Crítico. Revista Electrónica de Historia.* 2004; 4:1–21.
43. Valderrama J.M. Rummors, fear or epidemic? The bubonic plague of 1913–14 in the Atlantic Coast of Colombia. *História, Ciência, Saúde: Manguinhos.* 2001; 8:133–71. DOI: 10.1590/S0104-59702001000200007.
44. Barrera J.M. de la. Plague in Argentina. *Congreso Nacional sobre Enfermedades Endemoepidemicas.* 1942; 1:431.
45. Pollock J.S. McKm. Plague in Haifa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1948; 41:647.
46. Bramanti B., Dean K.R., Walløe L., Stenseth N.C. The third plague pandemic in Europe. *Proc. Biol. Sci.* 2019; 286(19):20182429. DOI: 10.1098/rspb.2018.2429.
47. Bernard L., Dounet G., Jaujon A. Report of plague in France. *Rec. Inst. Nat. Hyg. (Paris).* 1948; 2:355.
48. Vogler A.J., Chan F., Wagner D.M., Roumagnac P., Lee J., Nera R., Eppinger M., Ravel J., Rahalison L., Rasoamanana B.W., Beckstrom-Sternberg S.M., Achtman M., Chanteau S., Keim P. Phylogeography and molecular epidemiology of *Yersinia pestis* in Madagascar. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(9):e1319. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001319.
49. Boisier P., Rasolomaharo M., Ranaivoson G., Rasoamanana B., Rakoto L., Andrianirina Z., Andriamafazafy B., Chanteau S. Urban epidemic of bubonic plague in Majunga, Madagascar: epidemiological aspects. *Trop. Med. Int. Health.* 1997; 2(5):422–7.
50. Riehm J.M., Projahn M., Vogler A.J., Rajerison M., Andersen G., Hall C.M., Zimmermann T., Soanandrasana R., Andrianivoarimanana V., Straubinger R.K., Nottingham R., Keim P., Wagner D.M., Scholz H.C. Diverse genotypes of *Yersinia pestis* caused plague in Madagascar in 2007. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(6):e0003844. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003844.
51. Rogers L. The yearly variations in plague in India in relation to climate: forecasting epidemics. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 1928; 103:42–72. DOI: 10.1098/RSPB.1928.0024.
52. Davis D.H. Plague in Africa from 1935 to 1949: a survey of wild rodents in African territories. *Bull. World Health Organ.* 1953; 9(5):665–700.

53. Ben-Ari T., Neerinx S., Gage K.L., Kreppel K., LaDisoist A., Leirs H., Stenseth N.C. Plague and climate: scales matter. *PLoS Pathog.* 2011; 7(9):e1002160. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002160.

54. Benavides-Montaño J.A., Vadyvaloo V. *Yersinia pestis* resists predation by *Acanthamoeba castellanii* and exhibits prolonged intracellular survival. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83(13):e00593-17. DOI: 10.1128/AEM.00593-17.

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

56. Кошель Е.И., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Видяева Н.А., Гусева Н.П., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Определение систематической принадлежности почвенных амёб из очагов чумы Прикаспия на основе анализа участков рибосомного оперона. *Генетика.* 2015; 51(1):39-45. DOI: 10.7868/S0016675815010051.

57. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Видяева Н.А., Коннов Н.П. Молекулярные механизмы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2009; 4:6-13.

58. Wilkinson P., Paszkiewicz K., Moorhouse A., Szubert J.M., Beatson S., Gerrard J., Waterfield N.R., French-Constant R.H. New plasmids and putative virulence factors from the draft genome of an Australian clinical isolate of *Photobacterium aerophilum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010; 309(2):136-43. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02030.x.

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. 192 p.

2. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1999; 96(24):14043-8. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14043.

3. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.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.

4. Bos K.I., Schuenemann V.J., Golding G.B., Burbano H.A., Waglechner N., Coombes B.K., McPhee J.B., DeWitte S.N., Meyer M., Schmedes S., Wood J., Earn D.J., Herring D.A., Bauer P., Poinar H.N., Krause J. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black death. *Nature.* 2011; 478:506-10. DOI: 10.1038/nature10549.

5. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Waglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsall D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541-543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14(4):319-26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.

6. Drancourt M., Signoli M., Dang L.V., Bizot B., Roux V., Tzortzis S., Raoult D. *Yersinia pestis* Orientalis in remains of ancient plague patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(2):332-3. DOI: 10.3201/eid1302.060197.

7. Spyrou M.A., Keller M., Tukhbatova R.I., Scheib C.L., Nelson E.A., Andrade Valtueña A., Neumann G.U., Walker D., Alterauge A., Carty N., Cessford C., Fetz H., Gourvenec M., Hartle R., Henderson M., von Heyking K., Inskip S.A., Kacki S., Key F.M., Knox E.L., Later C., Maheshwari-Aplin P., Peters J., Robb J.E., Schreiber J., Kivisild T., Castex D., Lösch S., Harbeck M., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Phylogeography of the second plague pandemic revealed through analysis of historical *Yersinia pestis* genomes. *Nat. Commun.* 2019; 10(1):4470. DOI: 10.1038/s41467-019-12154-0.

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

9. Spyrou M.A., Tukhbatova R.I., Feldman M., Drath J., Kacki S., Beltrán de Heredia J., Arnold S., Sidiqov A.G., Castex D., Wahl J., Gazimzyanov I.R., Nurgaliev D.K., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Historical *Y. pestis* genomes reveal the European black death as the source of ancient and modern plague pandemics. *Cell Host Microbe.* 2016; 19(6):874-81. DOI: 10.1016/j.chom.2016.05.012.

10. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577-82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.

11. 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.

12. Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Al'khova Z.V., Oglodin E.G., Makashova M.A., Naryshkina E.A., Guseva N.P., Eroshenko G.A., Dang H.C., Lyong M.T., Vo V.K., Kutyrev V.V. [Phylogeny and historical-geographical analysis of *Yersinia pestis* strains from Vietnam]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):98-107. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-98-107.

13. WHO Africa. – Plague outbreak situation reports. (Cited 14 Dec 2017). [Internet]. Available from: <https://www.afro.who.int/health-topics/plague/plague-outbreak-situation-reports>.

14. Popov N.V., Eroshenko G.A., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Ivanova A.V., Oglodin E.G., Nikiforov K.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Chipanin E.V., Ayazbaev T.Z., Dzharparova A.K., Berdiev S.K., Lopatin A.A., Dubynsky V.M., Shcherbakova S.A., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kutyrev V.V. [Epidemiological situation on plague in 2020. Forecast of epizootic activity of natural plague foci in the Russian Federation and other CIS countries for 2021]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (1):52-62. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-52-62.

15. Wu Lien-teh, Chun J.W.H., Pollitzer R., Wu C.Y. Plague: a manual for medical and public health workers. Shanghai; 1936.

16. Arutyunov Yu.I., Pichurina N.L., Sud'ina L.V., Trukhachev A.L. [Plague in China: epidemiological and epizootiological aspects]. *Infektsionnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2019; 8(3):70-7. DOI: 10.24411/2305-3496-2019-13011.

17. Sharif M. Spread of plague in the southern and central divisions of Bombay Province and plague endemic centres in the Indo-Pakistan Subcontinent. *Bull. World Health Organ.* 1951; 4(1):75-109.

18. Gill C.A. The Genesis of Epidemics and the Natural History of Disease: an Introduction to the Science of Epidemiology Based upon the Study of Epidemics of Malaria, Influenza, and Plague. London; 1928.

19. Mahale K.N., Paranjape P.S., Marathe N.P., Dhote D.P., Chowdhury S., Shetty S.A., Sharma A., Sharma K., Tuteja U., Batra H.V., Shouche Y.S. Draft genome sequences of *Yersinia pestis* strains from the 1994 plague epidemic of Surat and 2002 Shimla outbreak in India. *Indian J. Microbiol.* 2014; 54(4):480-2. DOI: 10.1007/s12088-014-0475-7.

20. Gibbons R.J. Survey of Rocky Mountain spotted fever and sylvatic plague in western Canada during 1938. *Can. Public Health J.* 1939; 30:184.

21. Kaul P.M. *Epidem. Vital Statist. Rep.* 1949; 2:142.

22. Williams J.E., Hudson B.W., Turner R.W., Saroso J.S., Cavanaugh D.C. Plague in Central Java, Indonesia. *Bull. World Health Organ.* 1980; 58(3):459-65.

23. Kas'yan A.F., Dao Xuan Vinh, Bobrov A.G. [Characterization of some biological properties of plague pathogen strains circulating in Vietnam]. In: [Ecological and Epizootiological Aspects of Plague in Vietnam]. Moscow; Ho Chi Minh City Buon Ma Thuot; 2003, P. 96-8.

24. Suntsov V.V., Suntsova N.I., Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Dang Tuan Dat, Lyong Thi Mo, Sludsky A.A., Kouklev E.V., Tarasov M.A., Kas'yan I.A., Mayorov N.V., Astakhova T.S. [Anthropogenic foci of plague in Vietnam: past and present]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2014; (4):29-35. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-29-35.

25. Baxter-Tyrie C.C. Report of an outbreak of plague in Queensland during the first six months of 1904. *J. Hyg. (Lond.)*. 1905; 5(3):311-32. DOI: 10.1017/s0022172400002588.

26. Hussein A.G. Changes in the epidemiology of plague in Egypt, 1899-1951. *Bull. World Health Organ.* 1955; 13(1):27-48.

27. Mollaret H.H. [Concealing and denying the plague]. (In French) *Hist. Sci. Med.* 1995; 29(4):343-5.

28. Jorge R. La peste africaine, Paris. *Bull. Off. Int. Hyg. Publ.* 1935; 27(9):11-3.

29. Malek M.A., Bitam I., Drancourt M. Plague in Arab Maghreb, 1940-2015: a review. *Front. Public Health.* 2016; 4:112. DOI: 10.3389/fpubh.2016.00112.

30. Malek M.A., Hammani A., Beneldjouzi A., Bitam I. Enzootic plague foci, Algeria. *New Microbes New Infect.* 2014; 4:13-6. DOI: 10.1016/j.nmni.2014.11.003.

31. Benedictow O.J. Morbidity in historical plague epidemics. *Popul. Stud. (Camb.)* 1987; 41(3):401-31. DOI: 10.1080/0032472031000142976.

32. Hopkins G.H.E. Report on Rats, Fleas and Plague in Uganda. Entebbe; 1949. P. 15-8.

33. Davis D.H.S. Plague. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 1948; 42:207.

34. Faccini-Martínez Á.A., Sotomayor H.A. Historical review of the plague in South America: a little-known disease in Colombia. *Biomedica.* 2013; 33(1):8-27. DOI: 10.1590/S0120-41572013000100002.

35. Tavares C., Aragão A.I., Leal N.C., Leal-Balbino T.C., de Oliveira M.B., de Oliveira Gonçalves Ferreira G.M., de Almeida A.M. Plague in Brazil: from now and then. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954:69–77. DOI: 10.1007/978-1-4614-3561-7_10.
36. Vogler A.J., Sahl J.W., Leal N.C., Sobreira M., Williamson C.H.D., Bollig M.C., Birdsell D.N., Rivera A., Thompson B., Nottingham R., Rezende A.M., Keim P., Almeida A.M.P., Wagner D.M. A single introduction of *Yersinia pestis* to Brazil during the 3rd plague pandemic. *PLoS One.* 2019; 14(1):e0209478. DOI: 10.1371/journal.pone.0209478.
37. Laguna-Torres A., Gómez-Benavides J. La peste en el Perú. *Rev. Peru. Med. Trop.* 2004; 9(1):89–98.
38. Palacios M., Estévez E. La peste en el Ecuador, sus inicios y control. *Rev. Ecuat. Hig. Med. Trop.* 2006; 43:43–50.
39. Vega R. Peste bubónica en Ecuador. *Situación Epidemiológica Internacional.* 2004; 31:3.
40. Padilla M. La peste bubónica en Chuquisaca. *Rev. Inst. Med. Su.* 2007; 73:1–7.
41. Fagúndez M.A. El impacto de la peste bubónica en la ciudad de Caracas. 1908–1909. *Ensayos Históricos.* 2007; 19:167–79.
42. Cabrera J. La epidemia de peste bubónica en Iquique, 1903: un acercamiento global. *Pensamiento Crítico. Revista Electrónica de Historia.* 2004; 4:1–21.
43. Valderrama J.M. Rummors, fear or epidemic? The bubonic plague of 1913–14 in the Atlantic Coast of Colombia. *História, Ciência, Saúde: Manguinhos.* 2001; 8:133–71. DOI: 10.1590/S0104-59702001000200007.
44. Barrera J.M. de la. Plague in Argentina. *Congreso Nacional sobre Enfermedades Endemoepidemicas.* 1942; 1:431.
45. Pollock J.S. McKm. Plague in Haifa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1948; 41:647.
46. Bramanti B., Dean K.R., Walløe L., Stenseth N.C. The third plague pandemic in Europe. *Proc. Biol. Sci.* 2019; 286(1901):20182429. DOI: 10.1098/rspb.2018.2429.
47. Bernard L., Dounet G., Jaujon A. Report of plague in France. *Rec. Inst. Nat. Hyg. (Paris).* 1948; 2:355.
48. Vogler A.J., Chan F., Wagner D.M., Roumagnac P., Lee J., Nera R., Eppinger M., Ravel J., Rahalison L., Rasoamanana B.W., Beckstrom-Sternberg S.M., Achtman M., Chanteau S., Keim P. Phylogeography and molecular epidemiology of *Yersinia pestis* in Madagascar. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(9):e1319. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001319.
49. Boisier P., Rasolomaharo M., Ranaivoson G., Rasoamanana B., Rakoto L., Andrianirina Z., Andriamahefazy B., Chanteau S. Urban epidemic of bubonic plague in Majunga, Madagascar: epidemiological aspects. *Trop. Med. Int. Health.* 1997; 2(5):422–7.
50. Riehm J.M., Projahn M., Vogler A.J., Rajerison M., Andersen G., Hall C.M., Zimmermann T., Soanandrasana R., Andrianavoarimanana V., Straubinger R.K., Nottingham R., Keim P., Wagner D.M., Scholz H.C. Diverse genotypes of *Yersinia pestis* caused plague in Madagascar in 2007. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(6):e0003844. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003844.
51. Rogers L. The yearly variations in plague in India in relation to climate: forecasting epidemics. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 1928; 103:42–72. DOI: 10.1098/RSPB.1928.0024.
52. Davis D.H. Plague in Africa from 1935 to 1949: a survey of wild rodents in African territories. *Bull. World Health Organ.* 1953; 9(5):665–700.
53. Ben-Ari T., Neerincx S., Gage K.L., Kreppel K., Laudisoit A., Leirs H., Stenseth N.C. Plague and climate: scales matter. *PLoS Pathog.* 2011; 7(9):e1002160. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002160.
54. Benavides-Montaña J.A., Vadyvaloo V. *Yersinia pestis* resists predation by *Acanthamoeba castellanii* and exhibits prolonged intracellular survival. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83(13):e00593-17. DOI: 10.1128/AEM.00593-17.
55. Nikul'shin S.V., Onatskaya T.G., Lukanina L.M. [The study of the association of soil amoebas *Hartmannella rhyssodes* with bacteria – the causative agents of plague and pseudotuberculosis in the experiment]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1992; 69(9-10):2–4.
56. Koshel' E.I., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Vidyayeva N.A., Guseva N.P., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Determination of the taxonomy position of soil amoebas from the Precaspian plague foci based on the analysis of ribosomal operon regions]. *Genetika [Genetics]*. 2015; 51(1):39–45. DOI: 10.7868/S0016675815010051.
57. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Popov N.V., Vidyayeva N.A., Konnov N.P. [Molecular mechanisms of interaction between the plague pathogen and invertebrates]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2009; 4:6–13.
58. Wilkinson P., Paszkiewicz K., Moorhouse A., Szubert J.M., Beaton S., Gerrard J., Waterfield N.R., Ffrench-Constant R.H. New plasmids and putative virulence factors from the draft genome of an Australian clinical isolate of *Photobacterium aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010; 309(2):136–43. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02030.x.

Authors:

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

Об авторах:

Никифоров К.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-38-44

УДК 616.98:579.842.23

А.А. Слудский, З.Л. Девдариани

Рамнозопозитивные штаммы возбудителя чумы: вирулентность и эпидемиологическое значение

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

Цель обзора – показать необоснованность безоговорочной оценки рамнозопозитивных штаммов возбудителя чумы как авирулентных для большинства видов носителей чумы и человека и не имеющих эпидемиологического значения. Основными носителями рамнозопозитивных штаммов являются несколько видов полевок и монгольская пищуха. Подавляющее большинство специалистов придерживаются мнения, что рамнозопозитивные («полевочьи» и «пищуховые») штаммы *Yersinia pestis* авирулентны или слабовирулентны для многих видов теплокровных животных и человека, соответственно, не имеют эпидемиологического значения. Однако в сериях опытов по заражению рамнозопозитивными штаммами сурков, сусликов, больших песчанок часть экспериментальных животных болели остро и погибали от чумы. В природе рамнозопозитивные штаммы выделяли от трупов относительно резистентных красных сурков. При оценке эпидемиологического значения рамнозопозитивных штаммов опускается такой важнейший критерий, как наличие или отсутствие эффективных факторов и путей передачи возбудителя в очагах полевочьего и пищухового типов. Полевки и пищухи не употребляются в пищу, соответственно, невозможен контактный путь заражения людей в этих очагах. Второй путь передачи возбудителя человеку – трансмиссивный – затруднен из-за отсутствия миграции из нор на поверхность полевочьих блох и невысокой их эффективности как переносчиков. Тем не менее случаи заражения людей рамнозопозитивными штаммами возбудителя чумы на Кавказе и в Монголии дают основание утверждать, что хотя бы отдельные рамнозопозитивные штаммы обладают достаточно высокой вирулентностью и способны вызывать инфекционный процесс и у людей. Следовательно, нельзя полностью отказываться от эпидемиологического надзора в очагах чумы полевочьего и пищухового типов, возможно его проведение по сокращенной схеме.

Ключевые слова: возбудитель чумы, вирулентность возбудителя, эпидемиологический надзор, эпидемиологический подход, носители чумы, переносчики чумы.

Корреспондирующий автор: Слудский Александр Аркадьевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Слудский А.А., Девдариани З.Л. Рамнозопозитивные штаммы возбудителя чумы: вирулентность и эпидемиологическое значение. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 3:38–44. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-38-44

Поступила 11.02.2022. Принята к публ. 15.02.2022.

А.А. Sludsky, Z.L. Devdariani

Rhamnose-Positive Strains of Plague Agent: Virulence and Epidemiological Significance

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

Abstract. The aim of the review is to show the groundlessness of the unconditional assessment of rhamnose-positive strains of plague pathogen as avirulent for most species of carriers and humans and having no epidemiological significance. The main carriers of rhamnose-positive strains are several species of voles and the Mongolian pika. The vast majority of experts are of the opinion that rhamnose-positive (“vole’s” and “pika’s”) strains of *Yersinia pestis* are avirulent or weakly virulent for many species of warm-blooded animals and humans, and therefore have no epidemiological significance. However, in a series of experiments on infecting marmots, ground squirrels, and large gerbils with rhamnose-positive strains, some of the experimental animals fell ill acutely and died from the plague. In nature, rhamnose-positive strains have been isolated from carcasses of relatively resistant red marmots. When evaluating the epidemiological significance of rhamnose-positive strains, such an important criterion as the presence or absence of effective factors and pathways of pathogen transmission in foci of the vole and pika types is omitted. Voles and pikas are not eaten; therefore, the contact route of infecting humans in these foci is impossible. The second way of transmission of the pathogen to humans – vector-borne – is difficult due to the lack of migration of vole fleas from burrows to the surface and their low efficiency as vectors. Nevertheless, cases of human infection with rhamnose-positive strains of the plague agent in the Caucasus and Mongolia give grounds to assert that at least some rhamnose-positive strains have a sufficiently high virulence and are capable of causing infectious process in humans as well. Therefore, epidemiological surveillance in the foci of plague of the vole and pika types cannot be totally abandoned. It can be conducted according to an abbreviated scheme.

Key words: plague agent, pathogen virulence, epidemiological surveillance, epidemiological approach, plague carriers, plague vectors.

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

Corresponding author: Alexander A. Sludsky, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Sludsky A.A., Devdariani Z.L. Rhamnose-Positive Strains of Plague Agent: Virulence and Epidemiological Significance. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 3:38–44. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-38-44

Received 11.02.2022. Accepted 15.02.2022.

Sludsky A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4705-6151>

Цель обзора – показать необоснованность безоговорочной оценки рамнозопозитивных штаммов возбудителя чумы как авирулентных для большинства видов носителей чумы и человека и не имеющих эпидемиологического значения.

В природных очагах чумы полевого и пищевых типов циркулируют рамнозопозитивные штаммы *Yersinia pestis*, относящиеся к шести основным подвидам: *ssp. tibetica*, тибетскому (0.PE7); *ssp. caucasica*, кавказскому (0.PE2); *ssp. angolica*, ангольскому (0.PE3); *ssp. central asiatica*, центрально-азиатскому (0.PE4); *ssp. ulegeica*, улегейскому 0.PE5; *ssp. qinghaica*, цинхайскому 0.PE10. В центрально-азиатском подвиде выделяют четыре биовара: алтайский 0.PE4a, гиссарский 0.PE4h, таласский 0.PE4t, *microtus* 0.PE4m [1, 2]. На основании различий штаммов по медицинской значимости предложено поделить вид *Y. pestis* всего на два подвида: *subsp. microti* и *subsp. pestis* [3].

Общие свойства штаммов *Y. pestis* неосновных подвидов: способность ферментировать рамнозу в ранние сроки (1–2-е сутки) и избирательная вирулентность (они вирулентны для белых мышей и авирулентны или слабовирулентны для морских свинок). Основными носителями рамнозопозитивных штаммов возбудителя чумы являются несколько видов полевок и представитель отряда зайцеобразных – монгольская пищуха [4–8].

Доминирующая оценка эпидемиологического значения рамнозопозитивных штаммов. Большинство специалистов придерживаются мнения, что рамнозопозитивные штаммы *Y. pestis* авирулентны или слабовирулентны для многих видов теплокровных животных, а также, что важно подчеркнуть, для человека. Считается, что штаммы ряда неосновных подвидов (кавказского, тибетского, цинхайского, ангольского) характеризуются низкой эпидемической значимостью, штаммы центральноазиатского подвида не имеют эпидемической значимости и не вызывают чуму у людей [9, 10]. Основные критерии такой оценки: избирательная вирулентность рамнозопозитивных штаммов *Y. pestis*; результаты экспериментов китайских специалистов по заражению добровольцев рамнозопозитивным штаммом биовара *microtus*; отсутствие заболеваемости людей чумой в природных очагах, где циркулируют рамнозопозитивные штаммы возбудителя чумы. Китайские ученые показали, что у штаммов биовара *microtus* уникальный геномный профиль с утратой генов и распределением псевдогенов, который определяет его сниженную вирулентность для человека [11]. И действительно, в Китае на плато Ксилингол от полевок *Microtus brandti* выделены штаммы *Y. pestis*, авирулентные для крупных животных и людей, видимо, по причине отсутствия у них белков наружной мембраны 32 и 40 kD. Как известно, преодоление защитных барьеров теплокровного организма (резистентность чумного микроба к комплементу) обеспечивается интегральным белком наружной мембраны

Ail [12]. В 1994 г. в эксперименте на добровольцах показано, что «китайские» штаммы биовара *microtus* непатогенны для человека [13].

Необходимые дополнительные критерии для объективной оценки вирулентности и эпидемиологического значения рамнозопозитивных штаммов. На наш взгляд, экстраполировать данные китайских специалистов на все природные очаги, где циркулируют рамнозопозитивные штаммы, не корректно. Отсутствие названных белков наружной мембраны, вероятно, связано с мутациями в структуре клетки возбудителя чумы на территории только одного конкретного природного очага на плато Ксилингол. Американские специалисты считают, что каждая локальная эпизоотия вызывается отдельным клоном *Y. pestis* [14]. Природные очаги, где циркулируют рамнозопозитивные штаммы возбудителя чумы, расположены в горных массивах Кавказа, Гиссаро-Дарваза, Тянь-Шаня, Алтая, Хангая, Тибета, разобщены огромными расстояниями, отличаются ландшафтными и климатическими особенностями. Априори штаммы *Y. pestis*, циркулирующие на этих территориях, не могут быть абсолютно идентичными по свойствам. Рамнозопозитивным штаммам свойственна выраженная разнородность и геномная нестабильность. Штаммы *Y. pestis* из разных очагов полевого и пищевых типов обладают полиморфизмом как на фенотипическом, так и на генотипическом уровнях. Более того, даже в пределах одного очага существуют генотипические отличия между штаммами с удаленных друг от друга участков энзоотичной территории, к тому же эти отличия не полностью изучены. Имеются экспериментальные данные о высокой вирулентности единичных полевочьих штаммов из Закавказского высокогорного очага для морских свинок. Неоднородными по вирулентности оказались и штаммы из Восточно-Кавказского (Дагестанского) высокогорного полевого очага [6, 11, 15–22].

В ряде публикаций прошлых лет приводятся данные (обобщены в [23]), которые заставляют усомниться в безоговорочном признании авирулентности рамнозопозитивных штаммов возбудителя чумы для большинства видов теплокровных животных и, вероятно, человека. В сериях опытов по заражению серых сурков (*Marmota baibacina*) рамнозопозитивным «полевочьим» штаммом (*Y. pestis* *subsp. hissarica*), выделенным от блох в Гиссарском высокогорном очаге, пало 3 из 18 зверьков. При заражении «пищуховым» штаммом (*Y. pestis* *subsp. altaica*) из Горного Алтая пало 4 особи из 18 серых сурков. При подкожном заражении 20 длиннохвостых сусликов (*Spermophilus undulatus*) типичным штаммом алтайского подвида (*Y. pestis* *subsp. altaica*) от чумы пали 13 из 20 зверьков. Половина зверьков погибла от септической формы болезни: возбудителя высевали из всех органов, лимфоузлов и крови.

Большие песчанки (*Rhombomys opimus*), относящиеся к группе относительно резистентных к чуме

грызунов, зараженные штаммами возбудителя чумы, выделенными от людей в Африке и Вьетнаме, штаммом, выделенным от морской свинки в Бразилии, и «пищуховым» штаммом из Горного Алтая, оказались наиболее чувствительными к «пищуховому» рамнозопозитивному штамму. У всех павших зверьков отмечали генерализацию инфекционного процесса. Резистентными оказались большие песчанки к одному из штаммов, выделенных от людей в Конго. Показателен результат опытов по заражению больших песчанок «полевочным» штаммом из Закавказского высокогорного очага: погиб 21 зверек из 30 (70 %) с выделением культуры от 18 павших особей. Этот штамм вызывал бактериемию у больших песчанок, причем по показателям встречаемости бактериемии, а также по минимальным и максимальным срокам появления возбудителя в крови мало отличался от «песчаночьего» штамма из Среднеазиатского пустынного очага, относящегося к основному подвиду *Y. pestis* subsp. *pestis*, вызывающему заболевания людей.

Показательно, что в Гиссарском, Закавказском, Восточно-Кавказском, Таласском полевочных очагах, помимо основных носителей – полевок, чумой болеют обитающие там все другие виды грызунов (второстепенных носителей). Выделение возбудителя чумы от блох, собранных из шерсти и нор второстепенных носителей, указывает на острое развитие инфекционного процесса с возникновением бактериемии. В ходе эпизоотологического обследования в Таласском высокогорном очаге в 1977 г. от красных сурков (*Marmota caudata*), павших от чумы в естественных условиях, выделены два рамнозопозитивных штамма *Y. pestis*. В опытах эти штаммы оказались авирулентными для морских свинок. Подчеркнем, что красный сурок – относительно резистентный вид, более устойчивый к чуме, чем серый сурок (*M. baibacina*) и тарбаган (*M. sibirica*). В Гиссарском полевочном очаге в 1970 г. от красных сурков выделено восемь штаммов со всеми свойствами «полевочных», циркулирующих в этом очаге в популяции основного носителя – арчовой полевки (*Microtus carruthersi*). В Горно-Алтайском очаге в 1965 г. выделено от алтайских сурков четыре рамнозопозитивных штамма, не отличающихся по свойствам, характерным для *Y. pestis* subsp. *altaica*. На территории Монголии выделяли отдельные рамнозопозитивные штаммы от сурков алтайских (один штамм от трупа сурка) и тарбаганов.

В группе среднеазиатских пустынных очагов, где в популяциях большой песчанки циркулируют штаммы основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis*, иногда выделяют атипичные рамнозопозитивные штаммы.

Таким образом, приведенные выше данные указывают на то, что если не все, то хотя бы отдельные рамнозопозитивные штаммы обладают достаточно высокой вирулентностью.

Исходя из вышесказанного, необходимо еще раз обратиться к вопросу об эпидемиологическом

значении рамнозопозитивных штаммов. При оценке эпидемического потенциала природных очагов чумы принято учитывать наличие в истории очага антропонозного распространения чумы. Случаев заражения людей рамнозопозитивными штаммами возбудителя чумы в очагах полевочного типа: Восточно-Кавказском (основной носитель чумы – обыкновенная полевка), Гиссарском (основной носитель – арчовая полевка), Таласском (основные носители – предположительно серебристая и узкочерепная полевки), Горно-Алтайском (основной носитель – монгольская пищуха) – за историю документированных наблюдений не было. Очевидно, отсюда убежденность специалистов, что «полевочьи» и «пищуховые» рамнозопозитивные штаммы не имеют эпидемической значимости и не могут вызывать чуму у людей.

На самом деле при оценке эпидемиологического значения рамнозопозитивных штаммов опускается такой важнейший критерий, как оценка факторов и путей передачи возбудителя чумы в очагах полевочного и пищухового типов. На наш взгляд, низкий эпидемический потенциал очагов полевочного типа связан не только (возможно, и не столько) с пониженной вирулентностью рамнозопозитивных штаммов, сколько с отсутствием эффективных факторов и путей передачи.

Хорошо известно, что в природных очагах основные пути первичных заражений людей чумой – контактный и трансмиссивный. Люди заражаются чумой при разделке инфицированных сурков, сусликов, зайцев, кроликов, верблюдов. В Ливии описан случай заражения человека при разделке домашних коз [24]. В то же время полевки и пищухи не являются объектами охоты, не используются для употребления в пищу. Поэтому контактный путь заражения людей в очагах чумы полевочного и пищухового типа отсутствует.

В трансмиссивном заражении чумой людей участвуют прежде всего высокоэффективные переносчики, обитающие в жилищах человека, блохи *Xenopsylla cheopis*, *Pulex irritans*. В очагах чумы песчаночьего типа блохи, в том числе рода *Xenopsylla*, в случае гибели хозяев мигрируют из нор на поверхность и могут нападать на людей. Вероятность паразитарных контактов человека и специфических полевочных блох в природе ничтожно мала из-за отсутствия миграции этих эктопаразитов из нор на поверхность. К тому же среди специфических полевочных блох высокоэффективные переносчики отсутствуют. Однако редкие случаи заражения людей через укусы инфицированных блох в очагах чумы полевочного типа все же возможны. В 1975 г. на территории Закавказского высокогорного (полевочного) очага имел место случай бубонной формы чумы у человека в результате укуса блохи [4]. Правда, вид блохи не установлен. Экспериментально выявлена способность полевочных блох из Восточно-Кавказского (полевочного) высокогорного очага активно питаться кровью человека [25]. Рамнозопозитивные штаммы

образуют блок преджелудка у нескольких видов полевочьих блох (*Amphipsylla primaris*, *A. phaiomydis*, *Callopsylla caspia*, *Neospylla pleskei*, *Nosopsyllus consimilis*), а именно блокированные блохи наиболее эффективно передают возбудителя чумы донорам. Блокирование насекомого-переносчика конгломератом из клеток возбудителя чумы напрямую зависит от эффективности образования бактериальной биопленки. Эксперименты по определению способности к образованию биопленок у штаммов *Y. pestis* неосновных подвидов показали, что большинство изученных штаммов неосновных подвидов: кавказского, алтайского, гиссарского и улэгейского – формируют выраженную биопленку на абиотических поверхностях, наличие которой четко коррелирует с Pgm⁺(Hms⁺) фенотипом [26, 27].

Полевки могут переселяться из природных биотопов на приусадебные участки и проникать в жилища человека. На энзоотичной по чуме территории при посещении жилищ человека зараженными полевками последние могут стать объектами нападения блох *Pulex irritans* и *Xenopsylla cheopis* с последующей передачей возбудителя чумы людям. В опытах установлено, что рамнозопозитивные штаммы, выделенные от полевок, способны вызывать закупорку преджелудка у блох *X. cheopis*.

На развитие чумного инфекционного процесса влияет способность противостоять защитным механизмам врожденного иммунитета в коже при инфицировании возбудителем чумы [28, 29]. Отметим важный факт, что при использовании метода заражения «полевочьим» авирулентным для морских свинок штаммом с помощью блокированных блох *X. cheopis* подопытные животные погибали даже при кормлении на них одной блокированной блохи. Если на животных находились по 3–4 блохи, то погибало более 50 % морских свинок, если же 5 блох, то погибали все. Таким образом, при введении чумного микроба ssp. *caucasica* с помощью блох резко возрастала его вирулентность для морских свинок.

На основании результатов опытов [30, 31] сделано заключение: в природе возможна реверсия изначально авирулентных «полевочьих» штаммов к универсальной вирулентности, что может привести к заражению человека в эпидемически безопасных природных очагах. Доказана принадлежность двух клинических штаммов *Y. pestis* к кавказскому подвиду ssp. *caucasica*, что подтверждает способность этого подвида вызывать чуму у людей [21]. Описаны случаи выделения одного штамма *Y. pestis altaica* и двух штаммов *Y. pestis ulegeica* в 2015 г. от людей в Монголии [32].

Увеличение эпидпотенциала полевочьих очагов чумы может произойти в результате замещения рамнозопозитивных штаммов на рамнозонегативные. Такое событие в режиме реального времени прослежено нами на территории Гиссарского (полевочьего) высокогорного очага чумы. Все выделенные в 1970 г. штаммы (111 культур) разлагали рамнозу на 1–2-е

сутки. Культуры, выделенные в 1971–1977 гг., ферментировали этот сахар на 1–2-е сутки только в 13 % случаев, на 3–5-е сутки – в 87 % случаев. В последующие годы рамнозу разлагали на 1–2-е сутки от 3 до 30 % штаммов. Все пять штаммов возбудителя чумы, выделенные в 1991 г., не разлагали рамнозу в течение 10 суток. На этом фоне в Гиссарском очаге стали выделять отдельные штаммы, вирулентные для морских свинок. В Горно-Алтайском высокогорном (пищуховом) очаге также обнаружены четыре культуры, не ферментирующие рамнозу [33]. Как справедливо отмечают [34], для решения вопроса о степени опасности «полевочьих» штаммов для людей и выяснения их этиологической роли в отношении «человеческой» чумы требуются дополнительные исследования.

Китайские специалисты считали, что природный очаг чумы, где были выделены штаммы *microtus*, неопасен и не нуждается в эпидемиологическом надзоре [13]. Подобные взгляды, касающиеся очагов, в которых циркулируют рамнозопозитивные штаммы, могут декларироваться и среди специалистов в Российской Федерации. Поэтому мы полагаем, что, обсуждая вопросы эпидемиологического надзора за чумой в очагах полевочьего типа, не следует полностью отказываться от эпизоотологического обследования, проведения семинаров с медицинским персоналом лечебных учреждений, санитарно-разъяснительной работы с населением.

Необходимость осуществления постоянного эпидемиологического надзора в природных очагах полевочьего и пищухового типов ярко иллюстрируют события в Горно-Алтайском высокогорном очаге, на территории которого в 2014–2016 гг. произошли три случая заражения людей возбудителем чумы основного подвида *Y. pestis* spp. *pestis*, впервые выделенного в этом очаге от длиннохвостого суслика в 2012 г. [35]. Антропонозного распространения чумы в этом регионе удалось избежать за счет готовности специалистов общей медицинской сети к встрече с чумой, адекватного проведения лечебных и профилактических (тотальная вакцинация населения, полевая дезинсекция, поселковая дезинсекция и дератизация) мероприятий [36]. В свою очередь успешность проведения этих мероприятий базировалась на многолетнем опыте осуществления эпидемиологического надзора специалистами противочумных учреждений в Горно-Алтайском очаге. Гипотетически, если бы, например, эпидемиологический надзор в очаге, проводившийся с 1951 г., был свернут на основании представлений о безопасности для человека циркулирующих в этом очаге рамнозопозитивных штаммов, то избежать вспышки чумы в 2014–2016 гг. едва ли бы удалось.

В свете изложенных выше данных нам представляется, что в очагах чумы, где циркулируют рамнозопозитивные штаммы возбудителя чумы, хотя бы редкие заражения людей вполне вероятны. Для таких природных очагов можно рекомендовать разра-

ботку специального алгоритма эпизоотологического обследования по сокращенной схеме, как в очагах, на территории которых возбудитель чумы не выделяется в течение десяти и более лет [10].

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

Список литературы

1. Никифоров К.А., Морозов О.А., Носов Н.Ю., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Популяционная структура, таксономия и генетические особенности штаммов *Yersinia pestis* центральноазиатского подвида. *Генетика*. 2018; 54(10):1125–35. DOI: 10.1134/S0016675818100107.
2. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'hova J.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.
3. Кисличкина А.А., Кадникова Л.А., Майская Н.В., Платонов М.Е., Благодатских С.А., Мухина Т.Н., Соломенцев В.И., Богун А.Г., Анисимов А.П. Совершенствование внутривидовой классификации *Yersinia pestis* на основе данных полногеномного секвенирования. *Инфекция и иммунитет*. 2016; 6(3):46.
4. 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: Амрит; 2016. 248 с.
5. Корзун В.М., Балахонов С.В., Чипанин Е.В., Денисов А.В., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Ярыгина М.Б., Рождественский Е.Н., Фомина Л.А. Формирование, развитие и функционирование природного очага чумы в Горном Алтае. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2016; 1:17–25.
6. Вержуцкий Д.Б., Адъясурэн З. Природные очаги чумы в Монголии: аннотированный список. *Байкальский зоологический журнал*. 2019; 2:92–103.
7. Qin C.Y., Xu L., Zhang R.Z., Liu Q.Y., Li G.C., Fang X.Y. [Eco-geographic landscapes of natural plague foci in China V. Biological characteristics of major natural reservoirs of *Yersinia pestis*]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2012; 33(7):692–7. (in Chinese)
8. Mahmoudi A., Kryštufek B., Sludsky A., Schmid B.V., De Almeida A.M.P., Lei X., Ramasindrazana B., Bertherat E., Yeszhanov A., Stenseth N.C., Mostafavi E. Plague reservoir species throughout the world. *Integr. Zool.* 2021; 16(6):820–33. DOI: 10.1111/1749-4877.12511.
9. Трухачев А.Л., Васильева Е.А., Лебедева С.А., Синюткина В.В., Ракин А.В. Дифференциация штаммов возбудителя чумы в ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени на штаммы основного и неосновных подвидов. В кн.: Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: материалы международной конференции (23–24 июня 2015 г., Москва). М.; 2015. С. 384–6.
10. 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., Ашибаков 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.
11. Zhou D., Tong Z., Song Y., Han Y., Pei D., Pang X., Zhai J., Li M., Cui B., Qi Z., Jin L., Dai R., Du Z., Wang J., Guo Z., Wang J., Huang P., Yang R. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, *microtus*. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15):5147–52. DOI: 10.1128/JB.186.15.5147-5152.2004.
12. Kolodziejek A.M., Hovde C.J., Minnich S.A. *Yersinia pestis* Ail: multiple roles of a single protein. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2:103. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00103.
13. Fan Zhenya, Zhou Xiang, Luo Yunheng, Liu Jun, Wang Shenrong, Zhang Yaoping, Jin Lingling, Li Feng. The plague of vole (*Microtus brandii*) is harmless to human being. In: 7th Intern. Congr. on *Yersinia*. Nijmegen, June 14–16. *Medische Microbiol.* 1998; 6(Suppl. II):42.
14. Lowell J.L., Antolin M.F., Andersen G.L., Hu P., Stokowski R.P., Gage K.L. Single-nucleotide polymorphisms reveal spatial diversity among clones of *Yersinia pestis* during plague outbreaks in Colorado and the Western United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015; 15(5):291–302. DOI: 10.1089/vbz.2014.1714.
15. Балахонов С.В., Шестопалов М.Ю., Романова И.Ф. Результаты VNTR-анализа по локусу (5'-CAAA-3')ⁿ штаммов *Yersinia pestis* из активных природных очагов чумы Сибири. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2009; 3:14–16.
16. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности генов *yadA*, *inv* и *ail* и их экспрессия в штаммах *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов и *Yersinia pseudotuberculosis*. *Генетика*. 2010; 46(6):734–41.
17. Балахонов С.В., Корзун В.М., редакторы. Горно-Алтайский природный очаг чумы: Ретроспективный анализ, эпизоотологический мониторинг, современное состояние. Новосибирск: Наука-Центр; 2014. 272 с.
18. Платонов М.Е., Евсеева В.В., Светоч Т.Э., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Дентовская С.В., Куличенко А.Н., Анисимов А.П. Филогеография полевочных штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов Кавказа и Закавказья. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2012; 3:18–21.
19. Платонов М.Е., Евсеева В.В., Ефременко Д.В., Афанасьев М.В., Вержуцкий Д.Б., Кузнецова И.В., Шестопалов М.Ю., Дентовская С.В., Куличенко А.Н., Балахонов С.В., Анисимов А.П. Внутривидовая принадлежность рамнозопозитивных штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов чумы Монголии. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2015; 33(1):23–8.
20. Никифоров К.А., Одинокоев Г.Н., Новичкова Л.А., Ерошенко Г.А. Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* Алтайско-Гиссарской группы неосновных подвидов методом ПЦР. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 1:71–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-1-71-74.
21. Никифоров К.А., Альхова Ж.В., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Оглодин Е.Г., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Филогенетический анализ штаммов *Yersinia pestis* кавказского подвида из очагов Кавказа и Закавказья по данным полногеномного секвенирования. *Генетика*. 2019; 55(4):398–405. DOI: 10.1134/S0016675819040076.
22. Сердюк Н.С., Евченко И.В., Кузнецова И.В., Жилченко Е.Б., Жаринова Н.В., Коняева О.А., Мезенцев В.М., Волынкина А.С., Котенев Е.С., Платонов М.Е., Анисимов А.П., Куличенко А.Н. Определение филогенетического родства штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов чумы Кавказа методом мультилокусного VNTR-анализа. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 1:35–41. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-1-35-41.
23. Слудский А.А. Эпизоотология чумы (обзор исследований и гипотез). (Деп. в ВНИТИ 11.08.2014, № 231-В-2014). Саратов; 2014. Ч. 1. 313 с. [Электронный ресурс]. URL: www.microbe.ru/deponir/.
24. Christie A.B., Chen T.H., Elberg S.S. Plague in camels and goats: their role in human epidemics. *J. Infect. Dis.* 1980; 141(6):724–6. DOI: 10.1093/infdis/141.6.724.
25. Дегтярева Л.В., Лабунец Н.Ф., Осипова С.П., Щедрин В.И. Способность некоторых видов блох обыкновенной полевки из высокогорного Дагестана передавать и сохранять возбудителя чумы. *Паразитология*. 1990; 24(2):106–12.
26. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю., Коннов Н.П., Кузнецов О.С., Одинокоев Г.Н., Кутырев В.В. Изучение способности к образованию биопленок у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2009; 5:13–9.
27. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Видяева Н.А., Коннов Н.П. Молекулярные механизмы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2009; 4:6–13.
28. Nham T., Filali S., Danne C., Derbise A., Carniel E. Imaging of bubonic plague dynamics by *in vivo* tracking of bioluminescent *Yersinia pestis*. *PLoS One*. 2012; 7(4):e34714. DOI: 10.1371/journal.pone.0034714.
29. Подладчикова 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.
30. Анисимов Н.В., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Иванов С.А., Сухова М.А., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Способ отбора филогенетически близких штаммов *Yersinia pestis*, отличающихся по вирулентности для морских свинок. *Инфекция и иммунитет*. 2015; 4:35–7.
31. Анисимов Н.В., Кисличкина А.А., Платонов М.Е., Евсеева В.В., Кадникова Л.А., Липатникова Н.А., Богун А.Г., Дентовская С.В., Анисимов А.П. О происхождении гипервирулентности возбудителя чумы. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2016; 1:26–32.
32. Narankhatan N. Some characters of the pathogen *Y. pestis* found in patients with plague (2000–2015). In: Current Issues on Zoonotic Diseases. Ulaanbaatar; 2021. Vol. 24. P. 65–6.
33. Балахонов С.В., Логачев А.И., Михайлов Е.П., Шестопалов М.Ю., Белькова С.А., Ивженко Н.И., Мищенко А.И.

К характеристике штаммов чумного микроба, выделенных в Горно-Алтайском природном очаге в 1993–2000 гг. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2001; 4:64–8.

34. Трухачев А.Л., Лебедева С.А., Иванова В.С. Современное представление о вирулентности и эпидемической опасности штаммов «полевоцхей» (рамнозопозитивной) разновидности возбудителя чумы. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2007; 5:46–9.

35. Корзун В.М., Балахонов С.В., Косилко С.А., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Чипанин Е.В., Базарова Г.Х., Ярыгина М.Б., Абибулаев Д.Э., Шефер В.В. Особенности эпизоотической и эпидемической активности Горно-Алтайского природного очага чумы в 2012–2016 годах. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(1):36–8.

36. Попова А.Ю., Балахонов С.В., Щучинов Л.В., Матросов А.Н., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Шефер В.В., Шестаков В.А., Рождественский Е.Н., Чипанин Е.В., Корзун В.М., Косилко С.А., Иннокентьева Т.И., Ярыгина М.Б., Сбитнева С.В., Тагызова С.Л., Архипов Г.С., Щербакова С.А., Топорков В.П., Куклев Е.В., Раздорский А.С., Кузнецов А.А., Слудский А.А., Попов Н.В., Ермаков Н.М., Кутырев В.В. Организация противоэпидемических и профилактических мероприятий по чуме на территории Кош-Агачского района Республики Алтай и оценка их эффективности. *Инфекционные болезни*. 2018; 16(4):5–15. DOI: 10.20953/1729-9225-2018-4-5-15.

References

- Nikiforov K.A., Morozov O.A., Nosov N.Yu., Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Population structure, taxonomy and genetic features of *Yersinia pestis* strains of the subspecies *central asiatica*]. *Genetika [Genetics]*. 2018; 54(10):1125–35. DOI: 10.1134/S0016675818100107.
- Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'hova J.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.
- Kislichkina A.A., Kadnikova L.A., Maiskaya N.V., Platonov M.E., Blagodatskikh S.A., Mukhina T.N., Solomentsev V.I., Bogun A.G., Anisimov A.P. [Improving the intraspecific classification of *Yersinia pestis* based on whole genome sequencing data]. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2016; 6(3):46.
- Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Cadastre of Epidemic and Epizootic Manifestations of Plague on the Territory of the Russian Federation and Neighboring Countries (1876–2016)]. Saratov; 2016. 248 p.
- Korzun V.M., Balakhonov S.V., Chipanin E.V., Denisov A.V., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Yarygina M.B., Rozhdestvensky E.N., Fomina L.A. [Formation, development and functioning of the natural plague focus in Gorny Altai]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2016; (1):17–25.
- Verzhutsky D.B., Ad'yasuren Z. [Natural foci of plague in Mongolia: an annotated list]. *Baikalsky Zoologicheskyy Zhurnal [Baikal Zoological Journal]*. 2019; (2):92–103.
- Qin C.Y., Xu L., Zhang R.Z., Liu Q.Y., Li G.C., Fang X.Y. [Eco-geographic landscapes of natural plague foci in China V. Biological characteristics of major natural reservoirs of *Yersinia pestis*]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2012; 33(7):692–7. (in Chinese)
- Mahmoudi A., Kryštufek B., Sludsky A., Schmid B.V., De Almeida A.M.P., Lei X., Ramasindrazana B., Bertherat E., Yeszhanov A., Stenseth N.C., Mostafavi E. Plague reservoir species throughout the world. *Integr. Zool.* 2021; 16(6):820–33. DOI: 10.1111/1749-4877.12511.
- Trukhachev A.L., Vasil'eva E.A., Lebedeva S.A., Sinyutkina V.V., Rakin A.V. [Differentiation of plague agent strains for strains of the main and non-main subspecies, using PCR with registration of results in real-time mode]. In: Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Common Threats – Joint Actions. The Response of the BRICS States to the Challenges of Dangerous Infectious Diseases: Proceedings of International Conference (June 23–24, 2015, Moscow)]. Moscow; 2015. P. 384–6.
- 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.
- Zhou D., Tong Z., Song Y., Han Y., Pei D., Pang X., Zhai J., Li M., Cui B., Qi Z., Jin L., Dai R., Du Z., Wang J., Guo Z.,

Wang J., Huang P., Yang R. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, *microtus*. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15):5147–52. DOI: 10.1128/JB.186.15.5147-5152.2004.

12. Kolodziejek A.M., Hovde C.J., Minnich S.A. *Yersinia pestis* Ail: multiple roles of a single protein. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2:103. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00103.

13. Fan Zhenya, Zhou Xiang, Luo Yunheng, Liu Jun, Wang Shenrong, Zhang Yaoxing, Jin Lingling, Li Feng. The plague of vole (*Microtus brandti*) is harmless to human being. In: 7th Intern. Congr. on *Yersinia*. Nijmegen, June 14–16. *Medische Microbiol.* 1998; 6(Suppl. II):42.

14. Lowell J.L., Antolin M.F., Andersen G.L., Hu P., Stokowski R.P., Gage K.L. Single-nucleotide polymorphisms reveal spatial diversity among clones of *Yersinia pestis* during plague outbreaks in Colorado and the Western United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015; 15(5):291–302. DOI: 10.1089/vbz.2014.1714.

15. Balakhonov S.V., Shestopalov M.Yu., Romanova I.F. [Results of the VNTR-analysis in the locus (5'-CAAA-3')n of *Yersinia pestis* strains from the active natural foci of plague of Siberia]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2009; (3):14–6.

16. Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Kukleva L.M., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V. [Comparative analysis of the nucleotide sequence of the *yadA*, *inv*, and *ail* genes and their expression in strains of *Yersinia pestis* of the main and non-main subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis*]. *Genetika [Genetics]*. 2010; 46(6):734–41.

17. Balakhonov S.V., Korzun V.M., editors. [Gorno-Altai Natural Focus of Plague: Retrospective Analysis, Epizootiological Monitoring, Current State]. Novosibirsk; 2014. 272 p.

18. Platonov M.E., Evseeva V.V., Svetoch T.E., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Dentovskaya S.V., Kulichenko A.N., Anisimov A.P. [Phylogeography of vole strains of *Yersinia pestis* from natural foci of the Caucasus and Transcaucasia]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2012; (3):18–21.

19. Platonov M.E., Evseeva V.V., Efremenko D.V., Afanas'ev M.V., Verzhutsky D.B., Kuznetsova I.V., Shestopalov M.Yu., Dentovskaya S.V., Kulichenko A.N., Balakhonov S.V., Anisimov A.P. [Intraspecific appurtenance of rhamnose-positive strains of *Yersinia pestis* from natural plague foci in Mongolia]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2015; 33(1):23–8.

20. Nikiforov K.A., Odinkov G.N., Novichkova L.A., Eroshenko G.A. [Differentiation between *Yersinia pestis* strains of Altaic-Gissar group of non-main subspecies by means of PCR]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (1):71–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-1-71-74.

21. Nikiforov K.A., Al'khova Zh.V., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Oglodin E.G., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* strains of the Caucasian subspecies from the foci of the Caucasus and Transcaucasia based on whole genome sequencing data]. *Genetika [Genetics]*. 2019; 55(4):398–405. DOI: 10.1134/S0016675819040076.

22. Serdyuk N.S., Evchenko I.V., Kuznetsova I.V., Zhilchenko E.B., Zharinova N.V., Konyaeva O.A., Mezentshev V.M., Volynkina A.S., Kotenev E.S., Platonov M.E., Anisimov A.P., Kulichenko A.N. [Determination of the phylogenetic relations between *Yersinia pestis* strains from natural plague foci of Caucasus using multilocus VNTR analysis]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2017; (1):35–41. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-1-35-41.

23. Sludsky A.A. [Epizootiology of Plague (Review of Studies and Hypotheses)]. (Dep. at VINITI 11.08.2014, No. 231-B-2014). Saratov; 2014. Part 1. 313 p. [Internet]. Available from: www.microbe.ru/deponir/.

24. Christie A.B., Chen T.H., Elberg S.S. Plague in camels and goats: their role in human epidemics. *J. Infect. Dis.* 1980; 141(6):724–6. DOI: 10.1093/infdis/141.6.724.

25. Degtyareva L.V., Labunets N.F., Osipova S.P., Shchedrin V.I. [The ability of some fleas species of common vole from high-mountain Dagestan to transmit and preserve the plague pathogen]. *Parazitologiya [Parasitology]*. 1990; 6(2):106–12.

26. Vidyayeva N.A., Eroshenko G.A., Shavina N.Yu., Konnov N.P., Kuznetsov O.S., Odinkov G.N., Kutyrev V.V. [Studies of the ability to form biofilms in strains of *Yersinia pestis* of the main and non-main subspecies]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2009; (5):13–9.

27. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Popov N.V., Vidyayeva N.A., Konnov N.P. [Molecular mechanisms of the plague pathogen interaction with invertebrates]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2009; (4):6–13.

28. Nham T., Filali S., Danne C., Derbise A., Carniel E. Imaging of bubonic plague dynamics by *in vivo* tracking of bioluminescent

Yersinia pestis. *PLoS One*. 2012; 7(4):e34714. DOI: 10.1371/journal.pone.0034714.

29. Podladchikova O.N. [Modern views on the molecular mechanisms of plague pathogenesis]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; (3):33–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40.

30. Anisimov N.V., Kombarova T.I., Platonov M.E., Ivanov S.A., Sukhova M.A., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. [A method for selecting phylogenetically related *Yersinia pestis* strains that differ in virulence for guinea pigs]. *Infektsiya i Immunitet* [Infection and Immunity]. 2015; (4):35–7.

31. Anisimov N.V., Kislichkina A.A., Platonov M.E., Evseeva V.V., Kadnikova L.A., Lipatnikova N.A., Bogun A.G., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. [On the origin of the hypervirulence of the plague pathogen]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni* [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]. 2016; (1):26–32.

32. Narankhatan N. Some characters of the pathogen *Y. pestis* found in patients with plague (2000–2015). In: Current Issues on Zoonotic Diseases. Ulaanbaatar; 2021. Vol. 24. P. 65–6.

33. Balakhonov S.V., Logachev A.I., Mikhailov E.P., Shestopalov M.Yu., Bel'kova S.A., Ivzhenko N.I., Mishchenko A.I. [On the characteristics of the plague microbe strains isolated in the Gorno-Altai natural focus in 1993–2000]. *Karantinnye i Zoonoznye Infektsii v Kazakhstane* [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]. 2001; (4):64–8.

34. Trukhachev A.L., Lebedeva S.A., Ivanova V.S. [Modern concept of virulence and epidemic hazard of the strains of “vole” (rhamnose-positive) variety of plague pathogen]. *Infektsionnye Bolezni* [Epidemiology and Infectious Diseases]. 2007; (5):46–9.

35. Korzun V.M., Balakhonov S.V., Kosilko S.A., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Rozhdestvensky E.N., Chipanin E.V., Bazarova G.Kh., Yarygina M.B., Abibulaev D.E., Shefer V.V. [Peculiarities of epizootic and epidemic activity of the Gorno-Altai natural plague focus in 2012–2016]. *Epidemiologiya i Vaktsynoprofilaktika* [Epidemiology and Vaccinal Prevention]. 2017; 16(1):36–8.

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

Authors:

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

Об авторах:

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

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-45-52

УДК 616.98:578.833.2(571.54)

Н.И. Аюгин¹, Е.И. Андаев¹, А.Я. Никитин¹, С.С. Ханхареєв², Т.Ф. Истомина²

Классификация муниципальных образований Республики Бурятия по уровню заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация; ²Управление Роспотребнадзора по Республике Бурятия, Улан-Удэ, Российская Федерация

Клещевой вирусный энцефалит (КВЭ) является одной из значимых природно-очаговых инфекций в Российской Федерации. **Цель** исследования – провести анализ эпидемиологической ситуации по клещевому вирусному энцефалиту в Республике Бурятия за 2010–2020 гг. с последующей дифференциацией муниципальных образований по группам эпидемиологического риска для разработки предложений по оптимизации мер профилактики. **Материалы и методы.** Ретроспективный анализ эпидемиологической обстановки по КВЭ в Республике Бурятия проведен с использованием форм федерального статистического наблюдения № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» за 2010–2020 гг. и Референс-центра Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора об эпидемиологической ситуации и мерах профилактики КВЭ в муниципальных образованиях субъекта. Статистическая обработка выполнена стандартными методами вариационной статистики. На основе вычисления 95 % параметрического доверительного интервала для данных об изменчивости среднесезонных показателей инцидентности КВЭ в муниципальных образованиях Республики Бурятия за 10-летний период проведена их дифференциация по группам эпидемиологического риска. Для картографирования использовали программу QGIS 2.18.28 и набор открытых геоданных OpenStreetMap. **Результаты и обсуждение.** Все муниципальные образования по уровню эпидемиологического риска распределены в пять групп: с нулевой заболеваемостью КВЭ – 2 района, с низким уровнем – 4, средним – 8, высоким – 5, очень высоким – 2. Кроме того, в отдельную группу выделен административный центр. Каждая выделенная группа муниципальных образований охарактеризована по числу случаев КВЭ, уровню заболеваемости, обращаемости по поводу присасывания клещей, объемам мер специфической и неспецифической профилактики. Даны рекомендации по оптимизации тактики профилактики КВЭ в отдельных муниципальных образованиях.

Ключевые слова: клещевой вирусный энцефалит, Республика Бурятия, эпидемиологический риск, меры профилактики.

Корреспондирующий автор: Андаев Евгений Иванович, e-mail: e.andaev@gmail.com.

Для цитирования: Аюгин Н.И., Андаев Е.И., Никитин А.Я., Ханхареєв С.С., Истомина Т.Ф. Классификация муниципальных образований Республики Бурятия по уровню заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:45–52. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-45-52
Поступила 01.03.2022. Отправлена на доработку 24.03.2022. Принята к публ. 12.04.2022.

N.I. Ayugin¹, E.I. Andaev¹, A.Ya. Nikitin¹, S.S. Khankhareev², T.F. Istomina²

Classification of Municipalities in the Republic of Buryatia by the Level of Tick-Borne Viral Encephalitis Incidence

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

²Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Buryatia, Ulan-Ude, Russian Federation

Abstract. Tick-borne viral encephalitis (TBVE) is one of the most significant natural-focal infections in the Russian Federation. **The aim** of the study was to analyze the current epidemiological situation on TBVE in the Buryat Republic in 2010–2020 with a subsequent differentiation of municipalities by epidemiological risk groups in order to elaborate proposals for optimization of preventive measures. **Materials and methods.** A retrospective analysis of the epidemiological situation on TBVE in the Buryat Republic was carried out using forms of federal statistical surveillance No. 2 “Information on infectious and parasitic diseases” over 2010–2020 and the data from the Reference Center of the Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East of the Rospotrebnadzor on the epidemiological situation and preventive measures in the municipalities of the constituent entity. Statistical processing was performed applying conventional methods of variation statistics. Based on calculated 95 % parametric confidence interval for the data on variability of the long-term average TBVE incidence in the municipalities of the Republic of Buryatia over a 10-year period, the entities were differentiated by epidemiological risk groups. QGIS 2.18.28 and a set of open geodata OpenStreetMap were used for mapping. **Results and discussion.** All municipalities have been classified into five groups by the level of epidemiological risk: with zero TBVE incidence – 2 districts, with a low level – 4, medium – 8, high – 5, very high – 2. In addition, the administrative center has been placed into a separate group. Each individual group of municipalities is characterized by the number of TBVE cases, the level of morbidity, the frequency of seeking medical aid because of tick bites, the scope of specific and non-specific prevention measures. Recommendations for optimizing the tactics of TBVE prevention in certain municipal districts have been provided.

Key words: tick-borne viral encephalitis, Republic of Buryatia, epidemiological risk, preventive measures.

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

Corresponding author: Evgeny I. Andaev, e-mail: e.andaev@gmail.com.

Citation: Ayugin N.I., Andaev E.I., Nikitin A.Ya., Khankhareev S.S., Istomina T.F. Classification of Municipalities in the Republic of Buryatia by the Level of Tick-Borne Viral Encephalitis Incidence. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:45–52. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-45-52

Received 01.03.2022. Revised 24.03.2022. Accepted 12.04.2022.

Ayugin N.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8548-3595>

Andaev E.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6612-479X>

Nikitin A.Ya., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3918-7832>

Широко распространенный на Евразийском континенте клещевой вирусный энцефалит (КВЭ) является одной из значимых природно-очаговых инфекций в Российской Федерации [1–4]. Республика Бурятия до 2018 г. входила в число субъектов Сибирского федерального округа (СФО), который многие годы характеризуется самой высокой заболеваемостью КВЭ в стране: среднегодовой показатель (СПМ) за 2009–2017 гг. составил $(6,3 \pm 0,56)$ на 100 тыс. населения (‰_{0000}) [5]. При этом показатели заболеваемости в Республике Бурятия $(5,0 \pm 0,66 \text{‰}_{0000})$ находились на среднем уровне относительно других субъектов СФО. После включения Республики Бурятия, а также Забайкальского края в состав Дальневосточного федерального округа (ДФО) эти два субъекта стали определяющими в нем по инцидентности КВЭ: за 2009–2017 гг. этот показатель для ДФО равен $(0,67 \pm 0,06) \text{‰}_{0000}$.

Очевидно, что высокая заболеваемость КВЭ в Республике Бурятия требует целенаправленного анализа ее причин для оптимизации и повышения адресности проводимых мер профилактики инфекции, причем не только в других субъектах ДФО, но и стране в целом.

Республика Бурятия расположена в переходной зоне от горно-таежных районов Восточной Сибири к степям Центральной Азии. В республике встречаются различные ландшафтные зоны с преобладанием лиственных и хвойных лесов, в которых сформированы биоценозы, характерные для природных очагов КВЭ. Республика Бурятия включает 21 муниципальное образование (МО) и два города республиканского подчинения. Вся ее территория является эндемичной по КВЭ. Несмотря на тенденцию к снижению заболеваемости по сравнению с началом XXI в., эпидемиологическая обстановка на территории субъекта остается напряженной [5, 6], что обусловлено высокой степенью контакта населения с природными очагами. Еще одной особенностью Республики Бурятия является большой туристический поток. Так, за 2014 г. он составил 940 тыс. человек, т.е. более 95 % от числа проживающих в республике жителей [6]. Далеко не все туристы, приезжающие из различных регионов, в том числе из-за границы, привиты от КВЭ, что требует особого внимания к организации мер неспецифической профилактики, особенно в наиболее часто посещаемых туристами Кабанском и Тункинском районах. Согласно данным, поступающим в Референс-центр Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока

из субъектов Российской Федерации, поток невакцинированных лиц, перемещающихся по Республике Бурятия, приводит не только к росту заболеваемости на ее территории, но и способствует завозу КВЭ в другие регионы (Иркутская область, Забайкальский край, Монголия), которые на сегодняшний день характеризуются более низким уровнем заболеваемости [1, 6–8].

Немаловажной проблемой остается влияние климата и антропогенных факторов на ареал основного переносчика вируса клещевого энцефалита [9–12], которым в Республике Бурятия, как и на большинстве других территорий азиатской части Российской Федерации, является *Ixodes persulcatus*. В связи с этим дальнейшее развитие эпидемиологической ситуации по КВЭ в республике во многом будет определяться характером изменения площади лесного покрытия и уровнем антропогенного преобразования ее территории, развитием транспортной инфраструктуры и социальной сферы, особенно в области санаторно-курортного отдыха и туризма. Перечисленное требует осуществления постоянного эпидемиологического надзора за КВЭ в Республике Бурятия.

Цель исследования – провести анализ эпидемиологической ситуации по КВЭ в Республике Бурятия за 2010–2020 гг. с последующей дифференциацией муниципальных образований по группам эпидемиологического риска для разработки предложений по оптимизации мер профилактики.

Материалы и методы

В ходе ретроспективного эпидемиологического анализа рассмотрены данные об инцидентности КВЭ в МО Республики Бурятия за 2010–2020 гг., сведения об обращаемости в медицинские организации лиц, пострадавших от присасывания иксодовых клещей (2011–2019 гг.), и объемах проводимых мер профилактики КВЭ (2010–2019 гг.).

В основу исследования положены материалы федеральной статистической формы № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» за 2010–2020 гг. и Референс-центра по мониторингу КВЭ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока.

Дифференциация территорий МО по группам эпидемиологического риска выполнена по данным о заболеваемости КВЭ с применением параметрического метода расчета 95 % доверительного интервала (ДИ). Выбор параметрического метода

дифференциации территорий обусловлен хорошим соответствием выборки данных о заболеваемости населения в МО нормальному распределению, что проверялось с применением критерия, основанного на вычислении отношения величины размаха изменчивости к стандартному отклонению [13]. Кроме того, проведен анализ принадлежности отдельных «выпадающих» значений к исследуемой совокупности с применением непараметрического метода [14].

В работе рассчитаны средние арифметические значения, ошибки средних, проведена аппроксимация значений исследуемых показателей уравнением прямой линии регрессии с оценкой значимости коэффициента ее наклона. Статистическая обработка выполнена с использованием программы Excel. За обоснованные принимали различия (или выявленные тенденции) при уровне значимости $P < 0,05$.

Для создания карты использовалась программа QGIS 2.18.28 и набор открытых геоданных OpenStreetMap [15].

Результаты и обсуждение

За 2010–2020 гг. в Республике Бурятия выявлено 496 случаев КВЭ и отмечена статистически значимая ($F=7,2$; $P < 0,05$) тенденция к снижению заболеваемости (рис. 1, А). Средняя инцидентность КВЭ за это время составила $4,6 \text{ ‰}$. Наибольшую заболеваемость КВЭ наблюдали в 2011 г. – $8,1 \text{ ‰}$, что выше среднееголетнего показателя (СМП) в 1,8 раза. Минимальная заболеваемость – $2,7 \text{ ‰}$ (в 1,7 раза ниже СМП) зарегистрирована в 2013 г.

Уровень заболеваемости КВЭ существенно различается в отдельных МО. Особенностью распре-

ления случаев КВЭ по территориям субъекта является наличие МО, в которых отсутствует ежегодная заболеваемость КВЭ за рассматриваемый период. Периоды нулевой заболеваемости в отдельных МО достигали шести лет, а в Окинском и Еравнинском районах случаи КВЭ не зарегистрированы. Возможно, это обусловлено тем, что Окинский район (№ 22 на рис. 2) относится к горным и отделен от Тункинского МО (№ 2 на рис. 2), характеризующегося очень высокой инцидентностью КВЭ, горной тундрой, где практически не встречается *I. persulcatus*. На территории Еравнинского МО доминируют клещи рода *Dermacentor*, а *I. persulcatus* обитает лишь локально в благоприятных для вида местах.

Следует обратить внимание, что, несмотря на снижение уровня заболеваемости КВЭ в Республике Бурятия, обращаемость населения в медицинские организации по поводу присасывания клещей остается на стационарном уровне (визуально даже несколько возрастает). В период 2011–2020 гг. общее число пострадавших от присасывания клещей составило 36822 человека с варьированием по годам от 3221 до 4203. Рост числа пострадавших от присасывания клещей наблюдается на участках, где акарицидные обработки не проводили (лесные массивы, садовые и дачные некоммерческие товарищества). Акарицидные обработки осуществляются на участках массового пребывания людей (парки, турбазы, базы отдыха, места проведения религиозных обрядов и праздников, туристические тропы, территории придорожных предприятий общественного питания, кладбищ, летних оздоровительных организаций, лесных участков, прилегающих к населенным пунктам, и др.). За 2010–2014 гг. обработано 1888,3 га

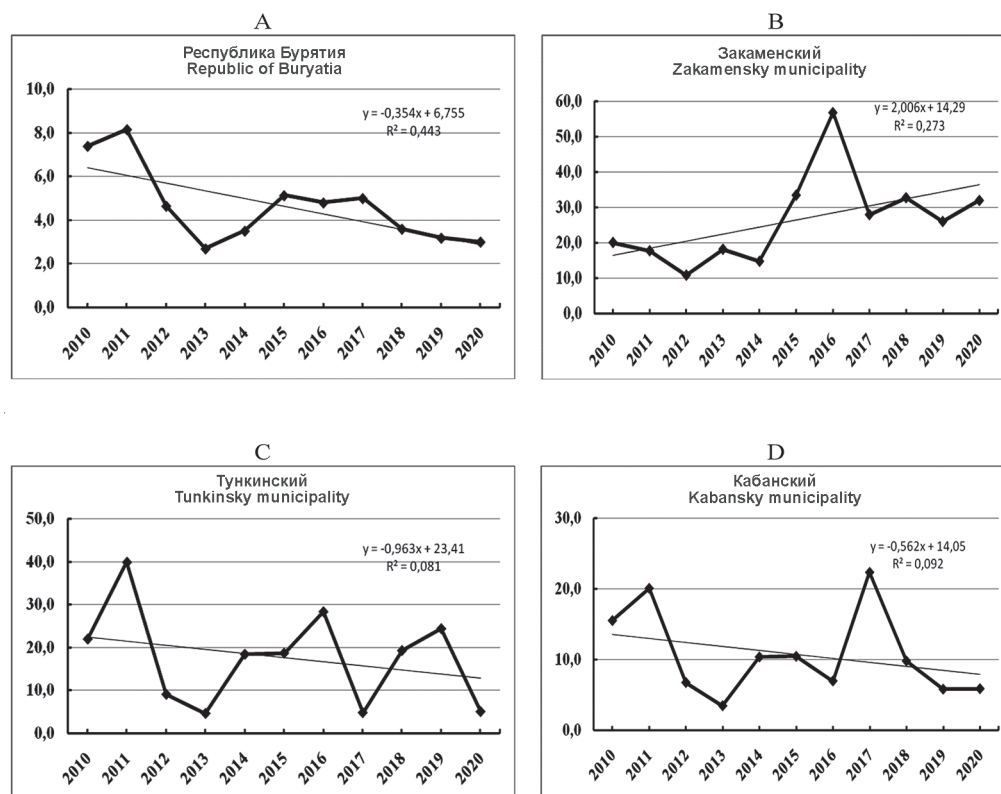


Рис. 1. Многолетняя динамика КВЭ в Республике Бурятия (А) и муниципальных образованиях с наиболее высокими показателями заболеваемости (В–Д) за 2010–2020 гг. На оси ординат – показатель на 100 тыс. населения, на оси абсцисс – годы

Fig. 1. Long-term dynamics of tick-borne viral encephalitis in Republic of Buryatia (A) and municipalities with the highest incidence rates (B–D) (2010–2020). Incidence rate per 100,000 population is shown on the y-axis, on the axis of abscissa – the years

социально значимых объектов, а за 2015–2020 гг. – 3978,1 га, что свидетельствует о росте внимания к этой мере профилактики КВЭ.

При оценке объемов мер специфической профилактики КВЭ, проводимых в Республике Бурятия за 2010–2019 гг., отмечается выраженный рост объемов вакцинации и ревакцинации. СМП количества ежегодно вакцинируемых лиц составил 18578,7 (с колебаниями от 16094,6 до 21062,8), ревакцинированных – 30255,5 (27926,0–32585,0).

В связи с тем, что в Республике Бурятия все административные территории относятся к эндемичным по КВЭ, в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», вакцинацией должно быть охвачено не менее 95 % детей с административных территорий, эндемичных по КВЭ, и не менее 95 % взрослого населения, проживающего на территориях с высоким риском заболевания, а также взрослого населения, по виду деятельности и роду занятий связанного с пребыванием в природ-

ных станциях, садоводствах, расположенных в районах, эндемичных по КВЭ. По данным ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Бурятия», охват прививками населения республики составляет 55 % для совокупного и 67 % для детского населения от запланированного объема. Среди контингентов профессиональных групп, подлежащих иммунизации, охват прививками достигает 100 % и более от плановых показателей.

На начальном этапе дифференциации МО по группам эпидемиологического риска, согласно применяемому алгоритму [16], в отдельный кластер выделена группа, включающая два МО с нулевой заболеваемостью (Г0), возможные причины чего обсуждены выше (рис. 2, таблица).

Затем проведена проверка принадлежности двух МО с очень высокой заболеваемостью КВЭ (Закаменский и Тункинский) к общей выборке (таблица). В результате показано, что они образуют самостоятельную группу (Г5). Административный центр Республики Бурятия (г. Улан-Удэ), единствен-

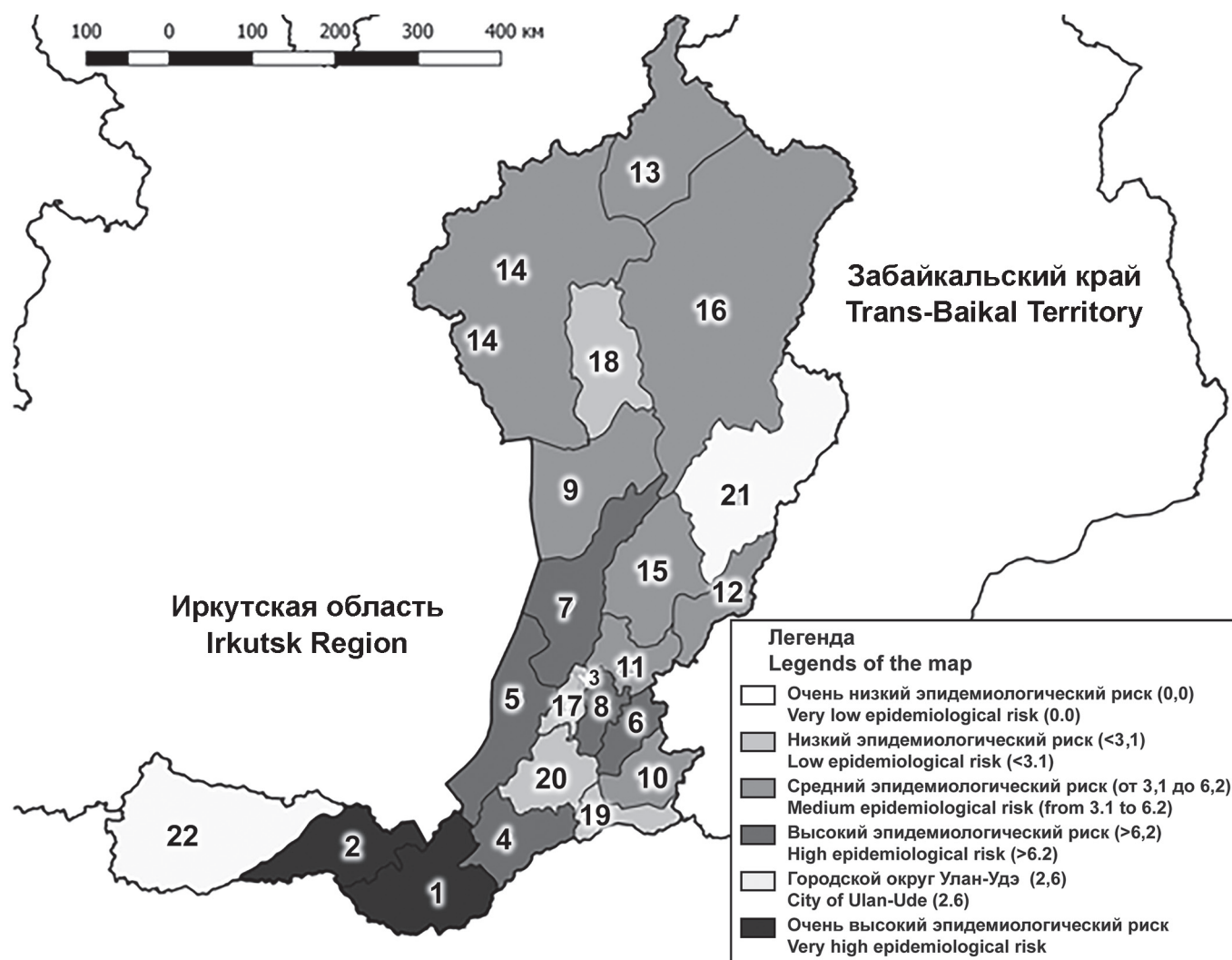


Рис. 2. Карта Республики Бурятия с муниципальными образованиями, ранжированными по эпидемиологическому риску проявления КВЭ (номера соответствуют названиям МО в таблице), (1:5500000)

Fig. 2. Map of the Buryat Republic with municipal districts ranked by the epidemiological risk of tick-borne viral encephalitis manifestation (numbers correspond to the names of the municipalities in the Table), (1:5500000 scale)

Дифференциация муниципальных образований Республики Бурятия по уровню заболеваемости КВЭ (2010–2020 гг.)*
Differentiation of municipalities in the Republic of Buryatia by the incidence of tick-borne viral encephalitis (2010–2020)*

№ No.	Наименование МО Name of the municipality	Среднегодовое значение показателя заболеваемости (на 100 тыс. населения) Long-term average incidence rate (per 100,000 population)	Группа эпидемиологи- ческого риска Epidemiological risk group	Суммарное число заболевших (2010–2020 гг.) Total number of cases (2010–2020)
1	Закаменский Zakamensky	26,3	5	75
2	Тункинский Tunkinsky	17,6	5	42
3	г. Улан-Удэ Ulan-Ude city	2,6	4	121
4	Джидинский Dzhidinsky	7,3	3	20
5	Кабанский Kabansky	10,7	3	67
6	Мухомобирский Mukhomobirsky	8,9	3	24
7	Прибайкальский Pribaikalsky	6,3	3	19
8	Тарбагатайский Tarbagataysky	8,9	3	15
9	Баргузинский Barguzinsky	3,4	2	9
10	Бичурский Bichursky	5,9	2	15
11	Заиграевский Zaigraevsky	3,7	2	20
12	Кижингинский Kizhinginsky	3,8	2	7
13	Муйский Muisky	4,1	2	5
14	Северо-Байкальский и г. Северобайкальск Severobaikalsky and Severobaikalsk city	4,7	2	20
15	Хоринский Khorinsky	4,8	2	9
16	Баунтовский Bauntovsky	3,1	2	3
17	Иволгинский Ivolginsky	1,9	1	9
18	Курумканский Kurumkansky	0,8	1	1
19	Кяхтинский Kyakhtinsky	1,2	1	5
20	Селенгинский Selenginsky	1,6	1	7
21	Еравнинский Eravninsky	0,0	0	0
22	Окинский Okinsky	0,0	0	0

Примечание: * – номер муниципального образования соответствует рис. 2.

Note: * – the municipality number corresponds to fig. 2.

ный, включен в группу Г4, которая не может анализироваться по изучаемым показателям наравне с другими МО в связи с особенностями социально-экономических условий жизни, плотностью населения, доступностью и уровнем медицинской помощи,

лабораторной диагностики и т.п. В частности, при инцидентности КВЭ в Улан-Удэ, характерной для МО группы Г1, среднегодовое число выявляемых случаев присасывания клещей к людям, число ежегодно прививаемых от КВЭ лиц, площади ака-

рицидных работ в административном центре выше, чем в этих районах в 15, 9 и 6 раз соответственно. Эти показатели для Улан-Удэ также выше по сравнению с МО в группах Г2, Г3, Г5.

В результате проведенной дифференциации выделено пять групп МО: Г0 включает два района, где отсутствуют случаи КВЭ за 2010–2020 гг.; группа Г1 объединяет пять районов низкого эпидемиологического риска с СМП заболеваемости ниже границы ДИ ($<3,1 \text{ ‰}$); Г2 включает восемь МО с уровнем заболеваемости в пределах ДИ (от 3,1 до $6,2 \text{ ‰}$); Г3 – территории пяти районов высокого эпидемиологического риска (выше $6,2 \text{ ‰}$); Г4 – административный центр субъекта (г. Улан-Удэ: СМП заболеваемости – $2,6 \text{ ‰}$; число случаев КВЭ – 121); Г5 – два района с очень высоким уровнем эпидемиологического риска (рис. 2, таблица).

Ниже рассмотрены особенности проявления КВЭ и организации мер профилактики инфекции в каждой из пяти групп, различающихся по уровню риска проявления КВЭ.

Территория двух МО группы Г0 составляет 52194 км^2 , где проживает около 22 тыс. жителей. За медицинской помощью по поводу присасывания клещей в этих МО за 10 лет обратилось 213 человек. Случаев КВЭ не выявлено. В среднем за год в МО группы Г0 вакцинируют от КВЭ 241 человека, ревакцинируют – 361. С учетом данных о заболеваемости КВЭ в этих МО и риска присасывания клещей, нет необходимости активизировать прививочную кампанию, если вакцинацией охвачены именно лица из контингента высокого риска заражения, например в силу сезонных работ на территориях активных очагов КВЭ. Акарицидные обработки в среднем проводятся на площади $9,9 \text{ га}$ в год. Желательна их привязка к выявленным местам наибольшего числа случаев присасывания клещей к людям.

Группа Г1 (с низким уровнем эпидемиологического риска) включает четыре района площадью 60496 км^2 и численностью населения около 118 тыс. человек. Всего за 10 лет на территории МО этой группы выявлено 22 случая КВЭ (СМП равен $(1,4 \pm 0,56) \text{ ‰}$). Количество пострадавших от присасывания клещей за 2011–2019 гг. составило 2365 (СМП – 66) человек. Во всех МО данной группы случаи КВЭ не регистрируют ежегодно. Максимальное их число за 10 лет отмечено в Иволгинском (9 случаев), наименьшее – в Курумканском (1 случай) районах. В среднем за год в МО группы Г1 вакцинируют 478 человек, ревакцинируют – 1133. Общая площадь акарицидных обработок, проводимых на территории социально значимых объектов, составила $3297,9 \text{ га}$ (СМП – $82,4 \text{ га}$).

В группу Г2 (со средним уровнем эпидемиологического риска) входит восемь МО с общей площадью 196900 км^2 . На данной территории проживают более 155 тыс. человек. За изучаемый период выявлено 88 заболевших КВЭ, при этом ежегодной регистрации случаев не наблюдается. Наибольшее число заболе-

вших отмечено в Северо-Байкальском и Заиграевском МО (по 20 случаев), наименьшее – в Муйском районе (5 случаев). Средний уровень заболеваемости КВЭ составил $(4,2 \pm 1,89) \text{ ‰}$. Количество обратившихся в медицинские организации после присасывания клещей – 6623 (СМП – 92 человека). Ежегодно от КВЭ вакцинируют 547 жителей, ревакцинируют – 1133. Общая площадь акарицидных обработок на социально значимых объектах МО из Г2 составляет $5129,8 \text{ га}$ (СМП – $641,2 \text{ га}$).

Группа Г3 (с высокой степенью эпидемиологического риска) включает пять МО общей площадью $40940,5 \text{ га}$, где проживает около 150 тыс. человек. За изучаемый период в МО данной группы выявлено 145 случаев КВЭ, при среднем уровне заболеваемости $(8,4 \pm 3,1) \text{ ‰}$. Ежегодно случаи КВЭ регистрируют только в Кабанском районе (в среднем 6 случаев за год), в котором отсутствует статистически значимая тенденция к снижению заболеваемости (рис. 1, D). За 2011–2019 гг. в медицинские организации МО этой группы обратилось 12070 человек, пострадавших от присасывания клещей (СМП – 268 человек). Причем в Кабанском МО наблюдается статистически значимый рост этого показателя ($F=13,3$; $P<0,01$). Ежегодно вакцинируют от КВЭ 755 человек, ревакцинируют – 1176. Акарицидными обработками охвачено $4918,8 \text{ га}$ территорий социально значимых объектов (СМП – $98,4 \text{ га}$).

Группа Г4 включает административный центр Республики Бурятия – г. Улан-Удэ с населением около 440 тыс. человек. За изучаемый период выявлен 121 случай КВЭ. Больных КВЭ регистрируют ежегодно с частотой от 7 до 18 случаев. СМП заболеваемости КВЭ составляет $2,6 \text{ ‰}$ (от $1,8$ до $3,5 \text{ ‰}$). В среднем за год (2010–2019 гг.) вакцинируют от КВЭ по 6383 человека, ревакцинируют – 7302. В медицинские организации в среднем за сезон обращается 1008 человек, пострадавших от присасывания клещей (суммарно 9078). Этот показатель находится на стационарном уровне ($F=0,7$; $P>0,05$). Акарицидные обработки в Улан-Удэ и пригородах проводятся на территориях социально значимых объектов в среднем на площади в 530 га за год. Исходя из уровня заболеваемости КВЭ, территория Улан-Удэ является менее эпидемиологически опасной, чем МО, входящие в группы Г3 и даже Г2. Вместе с тем СМП числа пострадавших от присасывания клещей в городе в несколько раз больше, чем в МО любой из перечисленных групп, кроме Кабанского района (группа Г3). Одной из причин ежегодной регистрации случаев КВЭ может являться выезд городских жителей на отдых в соседние МО с высоким эпидемиологическим риском.

Группа Г5 включает два МО: Закаменский и Тункинский. На их территории случаи КВЭ регистрируют ежегодно (в среднем 5 за год). За весь период выявлено 117 больных КВЭ при СМП заболеваемости – $(22,0 \pm 6,2) \text{ ‰}$. Причем за рассматриваемый период на территории этих МО отсутствует

статистическая значимая тенденция к снижению заболеваемости (рис. 1, В, С). Общая площадь территорий Закаменского и Тункинского районов составляет 27144,5 га. Проживает в них около 45 тыс. человек. В медицинские организации в среднем за сезон обращаются 160 человек, пострадавших от присасывания клещей (суммарно за десять лет) – 2888. Причем в Тункинском МО наблюдается значимый тренд к росту этого показателя ($F=27,8$; $P<0,01$). Ежегодное количество вакцинированных жителей МО из группы Г5 составляет 640 человек, ревакцинированных – 1503. Акарицидные обработки проводят на территориях социально значимых объектов. Их суммарная площадь за анализируемый период составила 2250,8 га (СМП – 112,5 га).

Закаменский и Тункинский МО группы Г5 находятся в зоне природных очагов с высоким риском заболевания КВЭ. В соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», среди населения, проживающего на территориях с высоким риском заболевания КВЭ, должна быть проведена обязательная массовая вакцинация. Учитывая, что Тункинский район наиболее посещаем туристами [6], значительное внимание необходимо обращать на наращивание объемов и адресность проводимых мер неспецифической профилактики, в том числе акарицидных обработок опасных участков, так как происходит рост числа пострадавших от присасывания клещей.

Тактика массовой вакцинации изложена в рекомендациях ВОЗ, где указано на ее необходимость при достижении порога заболеваемости КВЭ в 5,0 ‰ [17]. Следовательно, на территориях МО Республики Бурятия, которые входят в группы Г3 и Г5, необходимо увеличить объемы вакцинации населения.

Эпидемиологическая обстановка по КВЭ в двух МО группы Г5 является неблагоприятной, и в отличие от территории всей республики в них не происходит значимого снижения заболеваемости КВЭ (рис. 1, В, С). В этих МО необходимо проведение дополнительного мониторинга природных очагов КВЭ и анализа эпизоотолого-эпидемиологической ситуации для установления причин высокой заболеваемости и выбора адекватных профилактических мер с наращиванием их объемов.

На основании вышеизложенного предлагаем следующие рекомендации по специфической и неспецифической профилактике КВЭ на территории Республики Бурятия. Учитывая характер туристических потоков в Республике Бурятия, особое внимание необходимо уделить мерам неспецифической профилактики, в том числе проведению своевременных акарицидных обработок с нужной кратностью на территориях объектов из МО, входящих в группу Г5 (Закаменский, Тункинский), а также наиболее часто посещаемых отдыхающими и туристами, например в Кабанском районе (группа Г3). В райо-

нах с высоким и очень высоким риском заболевания (группы Г3 и Г5) необходимо проводить массовую вакцинацию против КВЭ (не менее 95 %) и экстренную иммуноглобулинопрофилактику по результатам экспресс-диагностики клещей, удаленных с пострадавших людей.

В районах среднего и низкого риска заболеваемости (группы Г1, Г2, Г4), а также в МО с отсутствием регистрации местных случаев КВЭ (группа Г0) необходимо проводить вакцинацию лицам, отнесенным к группам риска, и экстренную иммуноглобулинопрофилактику. Объемы акарицидных обработок должны увеличиваться в зависимости от риска заражения людей и числа пострадавших от присасывания клещей по группам территорий: от Г0, Г1 и Г2 до Г3–Г5.

На всех территориях необходимо проводить санитарно-гигиеническое просвещение. Население должно быть информировано об опасности заболевания КВЭ (в том числе при посещении территорий соседних МО), мерах и способах специфической и неспецифической профилактики болезни, а также о путях передачи возбудителя, основных его переносчиках и современных методах индивидуальной защиты от присасывания иксодовых клещей.

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

Список литературы

1. Erber W., Schmitt H.J., Janković T.V. TBE-epidemiology by country – an overview. Chapter 12a. In: Dobler G., Erber W., Bröker M., Schmitt H.J., editors. *The TBE Book*. 3rd ed. Singapore: Global Health Press; 2020. DOI: 10.33442/26613980_12a-3.
2. Чернохаева Л.Л., Холодилов И.С., Пакскина Н.Д. Современный ареал клещевого вирусного энцефалита в Российской Федерации. *Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН. Медицинская вирусология*. 2016; 30(1):6–22.
3. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природно-очаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. М.: Типография «Наука»; 2013. 463 с.
4. Злобин В.И., редактор. Клещевой энцефалит в XXI веке. М.: Наука; 2021. 471 с.
5. Носков А.К., Никитин А.Я., Андаев Е.И., Пакскина Н.Д., Яценко Е.В., Веригина Е.В., Иннокентьева Т.И., Балахонов С.В. Клещевой вирусный энцефалит в Российской Федерации: особенности эпидемиологического процесса в период устойчивого спада заболеваемости, эпидемиологическая ситуация в 2016 г., прогноз на 2017 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 1:37–43. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-37-43.
6. Данчинова Г.А., Ляпунов А.В., Хаснатинов М.А. Туризм и проблема «клещевых» инфекций в Республике Бурятия. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; 14(5):36–43. DOI: 10.31631/2073-3046-2015-14-5-36-43.
7. Цэрэнноров Д., Ууянга Б., Батцэцэг Ж., Баяр Ц., Байгалмаа Б., Нямсүрэн М. Результаты исследования клещевого энцефалита и анализ случаев заболевания людей в Монголии. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2014; 25:36–9.
8. Uyanga B., Burmaajav B., Tserennorov D., Otgonbayar D., Purevdulam L., Unursaikhan U., Undraa B. Geographical distribution of tick-borne encephalitis and its vectors in Mongolia, 2005–2016. *Cent. Asian. J. Med. Sci*. 2017; 3(3):250–8.
9. Hay S.I., Tatem A.J., Graham A.J., Goetz S.J., Rogers D.J. Global environmental data for mapping infectious disease distribution. *Adv. Parasitol.* 2006; 62:37–77. DOI: 10.1016/S0065-308X(05)62002-7.
10. Jaenson T.G., Värvi K., Fröjdman I., Jääskeläinen A., Rundgren K., Versteir V., Estrada-Peña A., Medlock J.M., Golovljova I. First evidence of established populations of the taiga tick *Ixodes persulcatus* (Acari: Ixodidae) in Sweden. *Parasit. Vectors*. 2016; 9(1):377. DOI: 10.1186/s13071-016-1658-3.

11. Sun R.X., Lai S.J., Yang Y., Li X.L., Liu K., Yao H.W., Zhou H., Li Y., Wang L.P., Mu D., Yin W.W., Fang L.Q., Yu H.J., Cao W.C. Mapping the distribution of tick-borne encephalitis in mainland China. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017; 8(4):631–9. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.04.009.

12. Сироткин М.Б., Коренберг Э.И. Влияние абиотических факторов на разные этапы развития таежного (*Ixodes persulcatus*) и европейского лесного (*Ixodes ricinus*) клещей. *Зоологический журнал.* 2018; 97(4):379–96. DOI: 10.7868/S0044513418040013.

13. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика; 1976. 598 с.

14. Терентьев П.В., Ростова Н.С. Практикум по биометрии: учеб. пособие. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та; 1977. 152 с.

15. Административно-территориальные границы Российской Федерации. База данных. [Электронный ресурс]. URL: https://mydata.biz/ru/catalog/databases/borders_ru (дата обращения 19.12.2021).

16. Туранов А.О., Никитин А.Я., Андаев Е.И., Балахонov С.В., Шашина Н.И. Дифференциация территории Забайкальского края по заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; 2:108–14. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-108-114.

17. Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2011; 86(24):241–56.

References

1. Erber W., Schmitt H.J., Janković T.V. TBE-epidemiology by country – an overview. Chapter 12a. In: Dobler G., Erber W., Bröcker M., Schmitt H.J., editors. *The TBE Book*. 3rd ed. Singapore: Global Health Press; 2020. DOI: 10.33442/26613980_12a-3.

2. Chernokhaeva L.L., Kholodilov I.S., Pakskina N.D. [The modern area of tick-borne viral encephalitis in the Russian Federation]. *Works of the Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis named after M.P. Chumakov, RAMS. Meditsinskaya Virusologiya [Medical Virology]*. 2016; 30(1):6–22.

3. Korenberg E.I., Pomelova V.G., Osin N.S. [Natural-Focal Infections Transmitted by Ixodidae Ticks]. Moscow: Nauka; 2013. 463 p.

4. Zlobin V.I., editor. [Tick-Borne Encephalitis in the XXI Century]. Moscow: Nauka; 2021. 471 p.

5. Noskov A.K., Nikitin A.Ya., Andaev E.I., Pakskina N.D., Yatsmenko E.V., Verigina E.V., Innokentiev T.I., Balakhonov S.V. [Tick-borne viral encephalitis in the Russian Federation: features of epidemic process in steady morbidity decrease period. Epidemiological condition in 2016 and the forecast for 2017]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (1):37–43. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-37-43.

6. Danchinova G.A., Lyapunov A.V., Khasnatinov M.A. [Tourism and the issue of tick-borne infections in the Republic of Buryatia]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2015; 14(5):36–43. DOI: 10.31631/2073-3046-2015-14-5-36-43.

7. Tserennorov D., Uyanga B., Battsetseg Zh., Bayar Ts., Baigalmaa B., Nyamsuren M. [Results of tick-borne encephalitis research and analysis of human cases in Mongolia]. *Dal'nevostochny*

Zhurnal Infektsionnoi Patologii [Far Eastern Journal of Infectious Pathology]. 2014; 25:36–9.

8. Uyanga B., Burmaajav B., Tserennorov D., Otgonbayar D., Purevdulam L., Unursaikhan U., Undraa B. Geographical distribution of tick-borne encephalitis and its vectors in Mongolia, 2005–2016. *Cent. Asian. J. Med. Sci.* 2017; 3(3):250–8.

9. Hay S.I., Tatem A.J., Graham A.J., Goetz S.J., Rogers D.J. Global environmental data for mapping infectious disease distribution. *Adv. Parasitol.* 2006; 62:37–77. DOI: 10.1016/S0065-308X(05)62002-7.

10. Jaenson T.G., Värvi K., Fröjdman I., Jääskeläinen A., Rundgren K., Versteirt V., Estrada-Peña A., Medlock J.M., Golovljova I. First evidence of established populations of the taiga tick *Ixodes persulcatus* (Acari: Ixodidae) in Sweden. *Parasit. Vectors.* 2016; 9(1):377. DOI: 10.1186/s13071-016-1658-3.

11. Sun R.X., Lai S.J., Yang Y., Li X.L., Liu K., Yao H.W., Zhou H., Li Y., Wang L.P., Mu D., Yin W.W., Fang L.Q., Yu H.J., Cao W.C. Mapping the distribution of tick-borne encephalitis in mainland China. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017; 8(4):631–9. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.04.009.

12. Sirotkin M.B., Korenberg E.I. [The influence of abiotic factors on different stages of development of taiga (*Ixodes persulcatus*) and European forest (*Ixodes ricinus*) ticks]. *Zoologicheskyy Zhurnal [Zoological Journal]*. 2018; 97(4):379–96.

13. Zaks L. [Statistical Evaluation]. Moscow: Statistika; 1976. 598 p.

14. Terent'ev P.V., Rostova N.S. [Workshop on Biometrics. Study Guide]. Leningrad: Publishing House of Leningrad University; 1977. 152 p.

15. [Administrative-territorial borders of the Russian Federation. Database]. (Cited 19 Dec 2021). [Internet]. Available from https://mydata.biz/ru/catalog/databases/borders_ru.

16. Turanov A.O., Nikitin A.Ya., Andaev E.I., Balakhonov S.V., Shashina N.I. [Differentiation of Transbaikalian Territory by tick-borne viral encephalitis incidence]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):108–14. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-108-114.

17. Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2011; 86(24):241–56.

Authors:

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

Khankhareev S.S., Istomina T.F. Rosпотребнадзор Administration in the Republic of Buryatia. 45b, Klyuchevskaya St., Ulan-Ude, 670013, Russian Federation. E-mail: org@03.rosпотребнадзор.ru.

Об авторах:

Аюгин Н.И., Андаев Е.И., Никитин А.Я. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилессера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Ханхареев С.С., Истомина Т.Ф. Управление Роспотребнадзора по Республике Бурятия. Российская Федерация, 670013, Улан-Удэ, ул. Ключевская, 45б. E-mail: org@03.rosпотребнадзор.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-53-60

УДК 616.98:578.834.1

Г.В. Борисевич¹, С.Л. Кириллова¹, И.В. Шатохина¹, В.Н. Лебедев¹, С.С. Соловьев²,
С.И. Сыромятникова¹, Н.В. Шагарова¹, Н.В. Боярская¹, Н.Г. Левкович¹, Д.А. Соляник¹, А.Ф. Андрус¹,
В.В. Рубцов¹, В.Т. Кротков¹, В.С. Кулиш¹, И.В. Суровяткина¹, В.Б. Кириллов¹, А.В. Ковальчук¹,
В.Б. Пантюхов¹, Д.А. Кутаев¹, С.В. Борисевич¹

Исследование методом проточной цитометрии клеточного иммунитета макак-резусов после экспериментального инфицирования вирусом SARS-CoV-2

¹ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад, Российская Федерация; ²ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

Клеточный иммунитет играет важную роль в патогенезе и формировании иммунной защиты по отношению к вирусу SARS-CoV-2. **Целью** работы являлось исследование методом проточной цитометрии клеточного иммунитета макак-резусов после экспериментального инфицирования вирусом SARS-CoV-2. **Материалы и методы.** Самцов макак-резусов интраназально инфицировали вирусом SARS-CoV-2, штамм Изолят В и штамм hCoV-19/Russia/SP48-1226/2020 (сокращенное название – У-2), в дозе 5,0 lg БОЕ. С использованием метода проточной цитометрии определены уровни 21 популяции/субпопуляции мононуклеарных клеток периферической крови животных до экспериментального инфицирования возбудителем и на 14-е сутки после инфицирования. РНК коронавируса SARS-CoV-2 определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Определение титра вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотках крови животных определяли в реакции нейтрализации по подавлению негативных колоний. **Результаты и обсуждение.** При инфицировании культурой штамма Изолят В выявлено увеличение относительного содержания общих Т-лимфоцитов ($p < 0,2$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($p < 0,1$), а также моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25 ($p < 0,2$). Снижение показано для общих В-лимфоцитов ($p < 0,2$) и Т-хелперов ($p < 0,1$). При инфицировании культурой штамма У-2 выявлено увеличение относительного содержания моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25 ($p < 0,2$). Таким образом, впервые в Российской Федерации методом проточной цитометрии проведено изучение клеточного иммунитета макак-резусов до и после экспериментального инфицирования вирусом SARS-CoV-2. Полученная информация может быть использована для исследования патогенеза вызванной SARS-CoV-2 инфекции, течения и исхода заболевания, разработки стратегий вакцинации и лечения.

Ключевые слова: вирус SARS-CoV-2, макаки-резусы, лимфоциты, моноциты, проточная цитометрия.

Корреспондирующий автор: Борисевич Галина Валентиновна, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Для цитирования: Борисевич Г.В., Кириллова С.Л., Шатохина И.В., Лебедев В.Н., Соловьев С.С., Сыромятникова С.И., Шагарова Н.В., Боярская Н.В., Левкович Н.Г., Соляник Д.А., Андрус А.Ф., Рубцов В.В., Кротков В.Т., Кулиш В.С., Суровяткина И.В., Кириллов В.Б., Ковальчук А.В., Пантюхов В.Б., Кутаев Д.А., Борисевич С.В. Исследование методом проточной цитометрии клеточного иммунитета макак-резусов после экспериментального инфицирования вирусом SARS-CoV-2. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:53–60. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-53-60

Поступила 14.05.2022. Отправлена на доработку 15.06.2022. Принята к публ. 18.07.2022.

G.V. Borisevich¹, S.L. Kirillova¹, I.V. Shatokhina¹, V.N. Lebedev¹, S.S. Solov'ev², S.I. Syromyatnikova¹,
N.V. Shagarova¹, N.V. Boyarskaya¹, N.G. Levkovich¹, D.A. Solyanik¹, A.F. Andrus¹, V.V. Rubtsov¹,
V.T. Krotkov¹, V.S. Kulish¹, I.V. Surovyatkina¹, V.B. Kirillov¹, A.V. Koval'chuk¹, V.B. Pantyukhov¹,
D.A. Kutaev¹, S.V. Borisevich¹

The Flow Cytometry Study of Cellular Immunity in Rhesus Monkeys after Experimental Infection with SARS-CoV-2 Virus

¹48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation;

²Scientific Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Abstract. Cellular immunity plays an important role in the pathogenesis and formation of protective immune defense against the SARS-CoV-2 virus. **The aim** of the work was to study the cellular immunity of rhesus monkeys applying flow cytometry after experimental infection with the SARS-CoV-2 virus. **Materials and methods.** Male rhesus monkeys were intranasally inoculated with the SARS-CoV-2 virus, Isolate B strain and hCoV-19/Russia/SP48-1226/2020 strain (abbreviated name U-2), at a dose of 5.0 lg PFU. Using flow cytometry, the levels of 21 populations/subpopulations of mononuclear cells in the peripheral blood of animals were determined before experimental infection with the pathogen and on day 14 after infection. SARS-CoV-2 coronavirus RNA was assessed using real-time polymerase chain reaction. Determination of the titer of virus-neutralizing antibodies to the SARS-CoV-2 virus in the blood sera of animals was conducted through neutralization test evaluating the ability to suppress negative colonies. **Results and discussion.** Infection with Isolate B strain culture has led to an increase in the relative content of total T-lymphocytes ($p < 0.2$), cytotoxic T-lymphocytes ($p < 0.1$), as well as monocytes expressing the early activation marker CD25 ($p < 0.2$). The decrease in levels has been observed for total B-lymphocytes ($p < 0.2$) and T-helper cells ($p < 0.1$). Infection with the U-2 strain culture revealed an increase in the relative content of monocytes expressing the early activation marker CD25 ($p < 0.2$). Thus, for the first time in the Russian Federation, flow cytometry was used to study the cellular immunity of rhesus monkeys

before and after experimental infection with the SARS-CoV-2 virus. The obtained information can be used for studying the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection, course, and outcome of the disease, and developing strategies for vaccination and treatment.

Key words: SARS-CoV-2-virus, rhesus monkeys, lymphocytes, monocytes, flow cytometry.

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

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

Citation: Borisevich G.V., Kirillova S.L., Shatokhina I.V., Lebedev V.N., Solov'ev S.S., Syromyatnikova S.I., Shagarova N.V., Boyarskaya N.V., Levkovich N.G., Solyanik D.A., Andrus A.F., Rubtsov V.V., Krotkov V.T., Kulish V.S., Surovyatkina I.V., Kirillov V.B., Koval'chuk A.V., Pantyukhov V.B., Kutaev D.A., Borisevich S.V. The Flow Cytometry Study of Cellular Immunity in Rhesus Monkeys after Experimental Infection with SARS-CoV-2 Virus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:53–60. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-53-60

Received 14.05.2022. Revised 15.06.2022. Accepted 18.07.2022.

Borisevich G.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0843-9427>

Kirillova S.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1245-9225>

Shatokhina I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9503-5120>

Lebedev V.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

Solov'ev S.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4706-0476>

Syromyatnikova S.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1490-9448>

Shagarova N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9523-8676>

Boyarskaya N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0237-9790>

Levkovich N.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2716-8455>

Solyanik D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3134-5629>

Andrus A.F., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7430-9401>

Rubtsov V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4387-0367>

Krotkov V.T., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7674-2321>

Kulish V.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0763-0809>

Surovyatkina I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7096-3580>

Kirillov V.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2916-0668>

Koval'chuk A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9681-9891>

Pantyukhov V.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1313-2059>

Kutaev D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9009-4909>

Borisevich S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Одно из перспективных направлений в современной инфекционной иммунологии – определение роли наиболее значимых антигенов, экспрессируемых иммунокомпетентными клетками, в реализации иммунного ответа при инфекционных заболеваниях [1]. Поскольку в патогенезе и формировании иммунной защиты по отношению к вирусу SARS-CoV-2 клеточный иммунитет играет важную роль [2–4], его оценка после экспериментального инфицирования макак-резусов с использованием метода проточной цитометрии (ПЦ) представляет собой в настоящее время актуальную задачу.

В процессе изучения клеточного иммунного ответа на внедрение инфекционного агента у человека в дополнение к оценке основных популяций мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) (лимфоцитов и моноцитов) определяются малые субпопуляции лимфоцитов, а также экспрессия маркеров ранней (CD25) и поздней активации (антигены главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) II класса HLA-DR) на МКПК [5]. При исследовании крови инфицированных вирусом SARS-CoV-2 обезьян ввиду схожести кроветворной и иммунной систем человека и макаки-резуса [6] можно придерживаться этого же перечня.

Целью настоящей работы являлось исследование методом проточной цитометрии клеточного иммунитета макак-резусов после экспериментального инфицирования вирусом SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Животные. В опытах использовали 10 здоровых самцов макак-резусов массой 2,5–3,0 кг, доставленных из питомника Адлерского приматологического центра (г. Сочи) и прошедших акклиматизацию. Эксперименты проводили в соответствии с ГОСТ 33218-2014 и Федеральным законом от 27.12.2018 № 498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными». Авторы подтверждают соблюде-

ние институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (протокол от 20.05.2021 № 3).

У инфицированных животных измеряли температуру ректально и массу тела на 3-и, 6, 10 и 14-е сутки после инфицирования. Образцы венозной крови собирали утром натощак после анестезии путем внутримышечного введения золетила из расчета 4–6 мг препарата на 1 кг массы тела в пробирки с напылением K₃-ЭДТА и пробирки с активатором свертывания.

РНК коронавируса SARS-CoV-2 в смывах из носа, носоглотки и ануса на 3-и и 6-е сутки после инфицирования, а также в пробах внутренних органов после гуманной эвтаназии животных на 14-е сутки определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [7]. В случае положительного результата в ПЦР-РВ определяли уровень накопления возбудителя в культуре клеток Vero C1008 по методу образования негативных колоний (НК) [8].

Вирус. Культуры вируса SARS-CoV-2: штамм Изолят В получен из ФГБУ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; штамм hCoV-19/Russia/SP48-1226/2020 (сокращенное название – У-2) выделен из носоглотки больного человека. Биологическая активность штаммов при титровании в культуре клеток Vero C1008 под агаровым покрытием составила 1,0·10⁶ БОЕ·мл⁻¹ (БОЕ – бляшкообразующая единица) и 1,0·10⁷ БОЕ·мл⁻¹ соответственно. Работы с вирусом проводили согласно требованиям СанПиН 3.3686-21. Культурой каждого штамма инфицировали по пять обезьян, вводя интраназально вирус в дозе 5,0 lg БОЕ. Инфицирующая доза возбудителя обоснована опытом работы сотрудников 48 ЦНИИ [9].

Определение титра вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотках

крови, полученных от обезьян перед инфицированием и через 14 суток после заражения, определяли в реакции нейтрализации (РН) по подавлению НК, образованных вирусом SARS-CoV-2 в односуточном моно слое культуры клеток Vero C1008 под агаровым покрытием. РН ставили в варианте: постоянная доза вируса – разведения сыворотки крови [10].

Проточно-цитометрический анализ. С целью выявления популяций МКПК обезьян применяли две панели конъюгированных с флуорохромами мышиных античеловеческих моноклональных антител (МКАТ), перекрестно реагирующих с антигенами лимфоцитов макак-резусов: CD20-FITC/CD16-PE/CD8-PC5/CD3-PE-Cy7 и CD4-FITC/CD25-PE/HLA-DR-ECD/CD8-PC5/CD3-PE-Cy7.

Поскольку процедура иммунофенотипирования обезьян идентична используемой для человека [11], составление цитометрических панелей и настраивание протоколов анализа проводили в соответствии со стандартизированной технологией и принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [12].

Использовали следующие МКАТ, входящие в состав цитометрических панелей: Becton Dickinson (США) (CD3-PE-Cy7, кат. № 557749; CD4-FITC, кат. № 550628; CD20-FITC, кат. № 6604106; CD25-PE, кат. № 341010); Beckman Coulter (США) (CD8-PC5, кат. № A07758; CD16-PE, кат. № A07766; HLA-DR-ECD, кат. № IM3636). Рабочие объемы МКАТ определяли путем титрования, рассчитывая для каждого разведения индекс окрашивания. Корректность компенсации проверяли с использованием FMO-подхода (Fluorescence-Minus-One, флуоресценция минус один) [13].

Для ПЦ-анализа забор крови у животных проводили в чистой зоне за 1 сутки до инфицирования (с целью определения фоновых показателей) и в заразной зоне на 14-е сутки после инфицирования, что обусловлено средним сроком появления специфических антител. Из пробирки с K_3 -ЭДТА отбирали кровь в цитометрические пробирки с предварительно внесенными антителами. После инкубации в темноте при комнатной температуре для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов в пробирки вносили реагент OptiLyse C (Beckman Coulter), кат. № 11895. Входящий в состав реагента формальдегид обеспечивал инактивацию вируссодержащего материала. Реакционную смесь повторно инкубировали в темноте при комнатной температуре, затем добавляли фосфатно-солевой буфер (PBS). Каждый этап внесения реагентов в пробирки сопровождали перемешиванием на лабораторной мешалке типа вортекс. После добавления буфера пробирки помещали в передаточный шлюз для обработки аэрозолем 10 % пероксида водорода в целях безопасной передачи из заразной зоны в чистую. Далее образцы дважды отмывали в PBS, после чего клетки ресуспендировали для анализа в фиксирующем буфере, содержащем формальдегид.

Иммунофенотипирование осуществляли на цитофлуориметре FC 500 (Beckman Coulter), оснащенном аргоновым лазером с программным обеспечением CXP, версия 2.3, анализируя в каждой пробе не менее 10000 лимфоцитов. Цитометрические данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Kaluza v.2.1. Показатели анализировали с использованием критериев Стьюдента и Уайта средствами Microsoft Office Excel 2016.

Результаты и обсуждение

С использованием двух цитометрических панелей определяли уровни 21 популяции МКПК (в процентном выражении для соответствующих популяций/субпопуляций) у 10 макак-резусов до экспериментального инфицирования вирусом SARS-CoV-2, штаммы Изолят В и У-2, и на 14-е сутки после инфицирования.

В результате инфицирования обезьян культурой штаммов Изолят В и У-2 у животных обеих групп респираторные явления и гибель не зафиксированы. Обезьяны демонстрировали умеренное снижение аппетита. Гипертермия отмечена у двух животных, инфицированных штаммом Изолят В, и четырех животных, инфицированных штаммом У-2 (у последних лихорадочное состояние продолжалось более длительное время). Мониторинг массы тела показал некоторое ее снижение у обезьян, инфицированных культурой штамма У-2, вероятно, из-за длительного лихорадочного состояния. В сыворотках крови животных обеих групп титр ВНА против вируса на 14-е сутки составлял менее 1:5. РНК вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР-РВ не выявлена ни в одной из проб органов животных.

В группе обезьян, инфицированных культурой штамма Изолят В, генетический материал вируса обнаружили только в пробах из носоглотки и ануса от одного животного, у него же зафиксировали повышение температуры тела на 3-и и 6-е сутки. Биологическая активность вируса в смыве из ротоглотки составляла менее $1,34 \lg \text{БОЕ} \cdot \text{мл}^{-1}$. У всех животных зафиксировано уменьшение относительного содержания В-лимфоцитов, Т-хелперов, увеличение цитотоксических Т-лимфоцитов и субпопуляций моноцитов, несущих маркеры ранней и поздней активации. У четырех животных из пяти увеличилось относительное содержание натуральных киллеров.

В группе обезьян, инфицированных культурой штамма У-2, РНК вируса обнаружили в пробах от трех особей. Уровень накопления вируса в высевах из носоглотки на 6, 10 и 14-е сутки не превышал $1,34 \lg \text{БОЕ} \cdot \text{мл}^{-1}$. Показатели клеточного иммунитета претерпели меньшие и разнонаправленные изменения в отличие от показателей животных, инфицированных культурой штамма Изолят В. Статистический анализ данных показателей клеточного иммунитета животных представлен в таблице.

Статистические характеристики показателей клеточного иммунитета у экспериментальных животных до и после инфицирования вирусом SARS-CoV-2 (штаммы Изолят В и У-2)
Statistical characteristics of indicators of cellular immunity in experimental animals before and after infection with the SARS-CoV-2 virus (Isolate В and U-2 strains)

Популяции и субпопуляции МПКК (фенотип) Populations and subpopulations of mononuclear cells of peripheral blood (PBMCs) (phenotype)	Содержание МПКК до и после инфицирования, $X_{ср} \pm \sigma$ PBMC content before and after infection, $X_{\text{avg}} \pm \sigma$					Различия до и после инфицирования по критерию ... штаммом ... Differences before and after infection according to ... test with strain ...			
	Изолят В Isolate B		У-2 U-2		после after	Стьюдента Student's			Уайта White's
	до before	после after	до before	У-2 U-2		Изолят В Isolate B	У-2 U-2		
								2	
1	Т-лимфоциты общие (CD3 ⁺ CD20 ⁻) ¹ T-lymphocytes, total (CD3 ⁺ CD19 ⁻) ¹	44,76±3,48	50,12±8,14	37,75±7,85	41,28±6,07	—	—	↑	—
	В-лимфоциты общие (CD3 ⁺ CD20 ⁺) ¹ B-lymphocytes, total (CD3 ⁺ CD19 ⁺) ¹	33,86±8,50	25,04±7,47	29,4±9,43	25,93±9,41	↓	—	↓	—
	Натуральные киллеры (CD3 ⁺ CD16 ⁺) ¹ Natural killer cells (CD3 ⁺ CD16 ⁺) ¹	18,21±7,68	21,09±8,64	28,94±9,39	28,85±7,62	—	—	—	—
	NK Т-клетки (CD3 ⁺ CD16 ⁺) ¹ NK T-cells (CD3 ⁺ CD16 ⁺) ¹	0,48±0,48	0,99±1,12	1,01±1,52	1,02±1,08	—	—	—	—
	Натуральные киллеры, экспрессирующие CD8 (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD8 ⁺) ² Natural killer cells expressing CD8 (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD8 ⁺) ²	78,88±19,6	80,37±13,95	89,61±4,76	90,2±3,25	—	—	—	—
	Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺) ³ T-helper cells (CD3 ⁺ CD4 ⁺) ³	47,43±4,97	42,26±4,07	48,14±6,04	47,6±7,52	↓	—	↓	—
	Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD8 ⁺) ³ Cytotoxic T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD8 ⁺) ³	42,82±6,59	48,1±6,13	43,09±5,91	42,5±6,71	—	—	↑	—
	Дубль-позитивные Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺) ³ Double-positive T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺) ³	3,55±1,37	3,9±1,96	3,81±0,60	4,03±1,69	—	—	—	—
	Дубль-негативные Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻) ³ Double-negative T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻) ³	6,11±2,42	5,61±2,59	4,82±0,73	5,69±1,78	—	—	—	—
	Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3 ⁺ CD25 ⁺) ³ T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3 ⁺ CD25 ⁺) ³	5,69±1,48	4,92±1,39	5,99±1,78	6,36±1,60	—	—	—	—
	Т-хелперы, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁻) ⁴ T-helper cells expressing the early activation marker (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁻) ⁴	8,17±2,20	7,84±1,82	8,86±1,89	8,79±0,75	—	—	—	—
	Т-лимфоциты цитотоксические, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁻) ⁵ Cytotoxic T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁻) ⁵	1,63±0,49	1,32±0,6	1,50±0,43	1,61±0,46	—	—	—	—

Окончание таблицы / Ending of table

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺) ⁶ Double-positive T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺) ⁶	12,70±6,03	9,80±6,49	9,46±6,03	7,73±6,00	–	–	–	–
Дубль-негативные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺) ⁷ Double-negative T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺) ⁷	0,46±0,15	0,85±0,92	0,50±0,21	0,74±0,49	–	–	–	–
Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺) ³ T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺) ³	4,59±3,15	3,34±1,66	3,83±2,37	3,83±1,47	–	–	–	–
Т-хелперы, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺) ⁴ T-helper cells expressing the late activation marker (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺) ⁴	1,5±1,23	0,93±0,72	1,57±0,55	1,26±0,77	–	–	–	–
Т-лимфоциты цитотоксические, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺) ⁵ Cytotoxic T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺) ⁵	4,85±3,86	3,37±2,62	8,49±7,87	5,17±3,11	–	–	–	–
Дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺) ⁶ Double-positive T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺) ⁶	4,37±3,07	4,45±3,43	7,44±4,60	5,06±3,00	–	–	–	–
Дубль-негативные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺) ⁷ Double-negative T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺) ⁷	45,27±21,66	40,00±17,2	36,52±21,39	38,07±18,30	–	–	–	–
Моноциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD25 ⁺) ⁸ Monocytes expressing the early activation marker (CD25 ⁺) ⁸	21,14±12,64	32,86±8,07	29,74±9,40	44,20±14,94	↑	↑	–	↑
Моноциты, экспрессирующие маркер поздней активации (HLA-DR ⁺) ⁸ Monocytes expressing the late activation marker (HLA-DR ⁺) ⁸	46,18±28,05	63,19±9,82	69,73±12,08	70,97±6,75	–	–	–	–

Примечание: данные по популяциям МКПК представлены в виде процентов от общего количества: 1 – лимфоциты, 2 – натуральные киллеры, 3 – Т-лимфоциты, 4 – Т-хелперы, 5 – цитотоксических Т-лимфоцитов, 6 – дубль-позитивных Т-лимфоцитов, 7 – дубль-негативных Т-лимфоцитов, 8 – моноциты; «↑» или «↓» – рост или снижение значения показателя после инфицирования; «–» – отсутствие различий между значениями показателя до и после инфицирования.

Note: data on populations of PBMC are shown as percentage of the total amount: 1 – lymphocytes, 2 – natural killers, 3 – T-lymphocytes, 4 – T-helpers, 5 – cytotoxic T-lymphocytes, 6 – double-positive T-lymphocytes, 7 – double-negative T-lymphocytes, 8 – monocytes; «↑» or «↓» – increase or decrease in the value of the indicator after infection; «–» – no differences between the values of the indicator before and after infection.

Сравнение средних значений показателей МКПК до и после инфицирования с использованием Т-критерия в группе животных, инфицированных культурой штамма Изолят В, выявило отличие для В-лимфоцитов общих, Т-хелперов и моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации ($p < 0,2$). У животных, инфицированных культурой штамма У-2, выявлено отличие только для моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации ($p < 0,2$).

Дополнительно проведены расчеты с использованием непараметрического критерия Уайта. Показаны следующие результаты до и после инфицирования:

- штаммом Изолят В: выявлены различия показателей Т-лимфоцитов общих и В-лимфоцитов общих ($p < 0,2$), а также показателей Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов ($p < 0,1$);

- штаммом У-2: различаются значения показателей только моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25 ($p < 0,1$).

Полученные данные свидетельствуют об отличиях в клинических и лабораторных проявлениях заболевания, возникшего у макак-резусов в результате инфицирования культурами различных штаммов вируса SARS-CoV-2. На 14-е сутки после инфицирования у животных, зараженных штаммом Изолят В, зафиксировано увеличение относительного содержания общих Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов и моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25; уменьшилось относительное содержание общих В-лимфоцитов и Т-хелперов. У большинства животных увеличилось относительное содержание натуральных киллеров. При этом практически полностью отсутствовали клиническая симптоматика и выделение вируса. Похожие реакции Т-лимфоцитов (более высокая функциональная активность CD8⁺ по сравнению с CD4⁺Т-клетками) описаны у пациентов с COVID-19 [14]. В группе, зараженной штаммом У-2, на фоне гипертермии и потери массы тела выделение возбудителя происходило у большинства животных, но зафиксировано достоверное изменение только одного показателя клеточного иммунитета (увеличение относительного содержания моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25).

Реакциями клеточного иммунитета под влиянием вируса можно объяснить более легкое течение заболевания у животных, инфицированных культурой штамма Изолят В. Увеличение моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25, и натуральных киллеров свидетельствует об активации системы врожденного иммунитета, к которой относятся упомянутые клетки. Увеличение популяции общих Т-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов говорит о подключении адаптивного иммунитета, причем уменьшением относительного содержания Т-хелперов можно объяснить снижение В-лимфоцитов, на которые Т-хелперы должны оказывать активирующее действие; следствием угнетения

В-лимфоцитов является отсутствие выработки ими ВНА. По данным литературы, у людей, как и у животных, при легком течении COVID-19 также наблюдалась активация Т-клеточного звена иммунитета на фоне низкой продукции антител [15, 16].

Можно предположить, что штамм У-2 сильнее угнетает систему клеточного иммунитета, чем штамм Изолят В. Зафиксирован только признак активации системы врожденного иммунитета – увеличение относительного содержания моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25. Несрабатыванием системы Т-, а затем и В-клеточного иммунитета, проявляющимся отсутствием ВНА, можно объяснить более тяжелое течение заболевания (температура, потеря массы тела) у животных, инфицированных культурой штамма У-2 [17]. В литературе описан вызываемый SARS-CoV-2 феномен лимфоцитарного истощения у инфицированных, обусловленный как прямой атакой коронавирусов на лимфоциты, так и индукцией апоптоза этих клеток [18, 19]. Таким образом, интерпретируя показатели клеточного иммунитета, можно анализировать патогенез инфекции и давать прогнозы в отношении исхода.

Для создания эффективных медицинских средств профилактики и лечения SARS-CoV-2-инфекции необходимым этапом является ее экспериментальное моделирование, в том числе на низших приматах (Primates: Strepsirrhini). Представители этого подотряда макаки-резусы (*Macaca mulatta*, *Macaca rhesus*) показали свою эффективность в качестве модели SARS-CoV-2-инфекции в ряде работ [20, 21].

Необходимо отметить, что в данном исследовании экспериментальная инфекция протекала у обезьян в легкой форме, что не совсем адекватно течению данного заболевания у человека, у которого COVID-19 может проходить в средней и тяжелой форме [22]. Также следует учитывать, что выраженность молекулярной мимикрии между белками вируса и хозяина для обезьян может отличаться от проявления данного феномена у человека [23]. Так, разнообразие генов белков МНС у этих животных шире, чем у людей [24]. Совпадение белковых последовательностей вируса и организма хозяина может существенно влиять на выраженность иммунного ответа и степень риска развития осложнений аутоиммунного характера, что особенно важно при разработке вакцин [25]. Многие особенности протекания инфекции у обоих видов еще предстоит определить, поэтому результаты следует интерпретировать осторожно.

Таким образом, впервые в Российской Федерации проведено изучение методом проточной цитометрии клеточного иммунитета макак-резусов после экспериментального инфицирования коронавирусом SARS-CoV-2. Полученная информация может быть использована для исследования патогенеза SARS-CoV-2-инфекции, течения и исхода заболевания, а также разработки стратегий вакцинации и лечения.

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

Список литературы

- Wieland E., Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin. Biochem.* 2016; 49(4-5):347–54. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2015.07.099.
- Chowdhury M.A., Hossain N., Kashem M.A., Shahid M.A., Alam A. Immune response in COVID-19: A review. *J. Infect. Public Health.* 2020; 13:1619–29. DOI: 10.1016/j.jiph.2020.07.001.
- Weiskopf D., Schmitz K.S., Raadsen M.P., Grifoni A., Okba N.M.A., Endeman H., van den Akker J.P.C., Molenkamp R., Koopmans M.P.G., van Gorp E.C.M., Haagmans B.L., de Swart R.L., Sette A., de Vries R.D. A phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci. Immunol.* 2020; 5:eabd2071. DOI: 10.1126/sciimmunol.abd2071.
- Иванова И.А., Омелченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Носков А.К. Роль клеточного звена иммунитета в формировании иммунного ответа при коронавирусных инфекциях. *Медицинская иммунология.* 2021; 6:1229–38. DOI: 10.15789/1563-0625-ROT-2302.
- Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян А.А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа). *Медицинская иммунология.* 2009; 2-3:227–38. DOI: 10.15789/1563-0625-2009-2-3-227-238.
- Лапин Б.А. К вопросу об использовании в медицинских экспериментах лабораторных приматов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2010; 2:3–6.
- Алексеев Я.И., Борисевич С.В., Варламов Д.А., Казанцев А.В., Карулина Н.В., Кириллов И.А., Кириллова С.Л., Кузубов А.В., Кутаев Д.А., Лебедев В.Н., Маноскин А.В., Мельников Д.Г., Павельев Д.И., Петров А.А., Сизикова Т.Е., Хмуренко С.Н., Целиков Е.М., Чухраля О.В. Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, возбудителя нового коронавирального заболевания COVID-19, методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции в реальном времени. Патент РФ № 2732608, опубл. 09.04.2020. Бюл. № 27.
- Сыромятникова С.И., Писцов М.Н., Борисевич С.В., Хамитов Р.А., Марков В.И., Максимов В.П. Состав агарового покрытия для титрования методом негативных колоний коронавируса – возбудителя тяжелого острого респираторного синдрома. Патент РФ № 2325436, опубл. 27.05.2008. Бюл. № 15.
- Логина С.Я., Щукина В.Н., Борисевич С.В., Сыромятникова С.И., Копылова Н.К., Борисевич Г.В., Андрощук И.А., Максимов В.А., Бондарев В.П. Разработка способа моделирования заболевания, вызываемого вирусом тяжелого острого респираторного синдрома, у лабораторных животных. *Молекулярная медицина.* 2009; 5:31–6.
- Васильев Д.А., Луговцев В.Ю. Учебно-методические материалы по подготовке к лабораторным и семинарским занятиям по курсу вирусологии (часть вторая – серологические реакции). Ульяновск; 2005.
- Sestak K., Scheiners C., Wu X.W., Hollemweguer E. Identification of anti-human CD 1antibodies reactive with rhesus macaque peripheral blood cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007; 1-2:21–6. DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.06.011.
- Хайдуков С.В., Байдун Л.В., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект). *Медицинская иммунология.* 2012; 14(3):255–68. DOI: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.
- Hammerbeck C., Goetz C., Bonnevier J. Primary and secondary antibodies and flow cytometry controls. In: *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert.* Cham: Springer; 2018. P. 75–103. [Электронный ресурс]. URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-98071-3_6 (дата обращения 10.12.2021).
- Li G., Fan Y., Lai Y., Han T., Li Z., Zhou P., Pan P., Wang W., Liu D., Liu X., Zhang Q., Wu J. Coronavirus infections and immune responses. *J. Med. Virol.* 2020; 4:424–32. DOI: 10.1002/jmv.25685.
- Gallais F., Velay A., Nazon C., Wendling M.-J., Partisani M., Sibilia J., Candon S., Fafi-Kremer S. Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 associated with cellular immune response without seroconversion. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 1:113–21. DOI: 10.3201/eid2701.203611.
- Thieme C.J., Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F.S., Hoelzer B., Konik M.J., Berger M.M., Brenner T., Tempfer C., Watzl C., Meister T.L., Pfander S., Steinmann E., Doff S., Dittmer U., Westhoff T.H., Witzke O., Stervbo U., Roch T., Babel N. Robust T cell response toward spike,

membrane, and nucleocapsid SARS-CoV-2 proteins is not associated with recovery in critical COVID-19 patients. *Cell Rep. Med.* 2020; 1:100092. DOI: 10.1016/j.xcr.2020.100092.

17. Sariol S., Perlman S. Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections. *Immunity.* 2020; 2:248–63. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.07.

18. Yuan X., Huang W., Ye B., Chen C., Huang R., Wu F., Wei Q., Zhang W., Hu J. Changes of hematological and immunological parameters in COVID-19 patients. *Int. J. Hematol.* 2020; 4:553–9. DOI: 10.1007/s12185-020-02930-w.

19. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G., Yuan Z., Feng Z., Zhang Y., Wu Y., Chen Y. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 2020; 11:827. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00827.

20. McMahon K., Yu J., Mercado N.B., Loos C., Tostnoski L.H., Chandrashekar A., Liu J., Peter L., Atyeo C., Zhu A., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., Jacob-Dolan C., Li Z., Nampanya E., Patel S., Pessaint L., van Ry A., Blade K., Yalley-Ogunro J., Cabus M., Brown R., Cook A., Teow E., Andersen H., Lewis M.G., Lauffenburger D.A., Alter G., Barouch D.H. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature.* 2021; 590:630–4. DOI: 10.1038/s41586-020-03041-6.

21. Chandrashekar A., Liu J., Martinot A.J., McMahon K., Mercado N.B., Peter L., Tostanoski L.H., Yu J., Maliga Z., Nekorchuk M., Busman-Sahay K., Terry M., Wrijil L.M., Ducat S., Martinez D.R., Atyeo C., Fischinger S., Burke J.S., Sleim M.D., Pessaint L., van Ry A., Greenhouse J., Taylor T., Blade K., Cook A., Finneyfrock B., Brown R., Teow E., Velasco J., Zahn R., Wegmann F., Abbink P., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., He X., Jacob-Dolan C., Kordana N., Li Z., Lifton M.A., Mahrokhian S.H., Maxfield L.F., Nityanandam R., Nkolola J.P., Schmidt A.G., Miller A.D., Baric R.S., Alter G., Sorger P.K., Estes J.D., Andersen H., Lewis M.G., Barouch D.H. SARS-CoV-2 infection protects against challenge in rhesus macaques. *Science.* 2020; 369:812–7. DOI: 10.1126/science.abd4776.

22. Shi S., Nie B., Chen X., Cai Q., Lin C., Zhao G., Zhang X. Clinical and laboratory characteristics of severe and non-severe patients with COVID-19: A retrospective cohort study in China. *Clin. Lab. Anal.* 2021; 1:e23692. DOI: 10.1002/jcla.23692.

23. Петрова Н.В., Ганина К.К., Тарасов С.А. Изучение чувствительности лабораторных животных к вирусу SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae; Betacoronavirus; Sarbecovirus). *Вопросы вирусологии.* 2021; 2:103–11. DOI: 10.36233/0507-4088-47.

24. Heijmans C.M.C., de Groot N.G., Bontrop R.E. Comparative genetics of the major histocompatibility complex in humans and nonhuman primates. *Int. J. Immunogenet.* 2020; 3:243–60. DOI: 10.1111/iji.12490.

25. Nakayama E., Saijo M. Animal models for Ebola and Marburg virus infections. *Front. Microbiol.* 2013; 4:267. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00267.

References

- Wieland E., Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin. Biochem.* 2016; 49(4-5):347–54. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2015.07.099.
- Chowdhury M.A., Hossain N., Kashem M.A., Shahid M.A., Alam A. Immune response in COVID-19: A review. *J. Infect. Public Health.* 2020; 13:1619–29. DOI: 10.1016/j.jiph.2020.07.001.
- Weiskopf D., Schmitz K.S., Raadsen M.P., Grifoni A., Okba N.M.A., Endeman H., van den Akker J.P.C., Molenkamp R., Koopmans M.P.G., van Gorp E.C.M., Haagmans B.L., de Swart R.L., Sette A., de Vries R.D. A phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci. Immunol.* 2020; 5:eabd2071. DOI: 10.1126/sciimmunol.abd2071.
- Ivanova I.A., Omel'chenko N.D., Filippenko A.V., Trufanova A.A., Noskov A.K. [Role of the cellular immunity in the formation of the immune response in case of coronavirus infections]. *Meditsinskaya Immunologiya [Medical Immunology]*. 2021; 23(6):1229–38. DOI: 10.15789/1563-0625-ROT-2302.
- Khaydukov S.V., Zurochka A.V., Totolyan A.A., Chereshev V.A. [Major and minor lymphocyte populations of human peripheral blood and their reference values, as assayed by multi-color cytometry] *Meditsinskaya Immunologiya [Medical Immunology]*. 2009; 11(2-3):227–38. DOI: 10.15789/1563-0625-2009-2-3-227-238.
- Lapin B.A. [Regarding the use of laboratory primates in medical experiments]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya [Pathological Physiology and Experimental Therapy]*. 2010; (2):3–6.
- Alexeev Ya.I., Borisevich S.V., Varlamov D.A., Kazantsev A.V., Karulina N.V., Kirillov I.A., Kirillova S.L., Kuzubov A.V., Kutaev D.A., Lebedev V.N., Manoskin A.V., Mel'nikov D.G., Paveliev D.I., Petrov A.A., Sizikova T.E., Khmurenko S.N.,

- Tselikov E.M., Chukhraya O.V. [A set of reagents for the detection of SARS-CoV-2 coronavirus RNA, pathological agent of new coronavirus disease COVID-19, using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (PCR-RV-2019-nCoV)]. RF Patent No. 2732608, publ. 09 Apr 2020. Bull. No. 27.
8. Syromyatnikova S.I., Pistov M.N., Borisevich S.V., Khamitov R.A., Markov V.I., Maksimov V.P. [The composition of the agar coating for titration by the method of negative colonies of coronavirus – the causative agent of severe acute respiratory syndrome]. RF Patent No. 2325436, publ. 27 May 2008. Bull. No. 15.
9. Loginova S.Ya., Shchukina V.N., Borisevich S.V., Syromyatnikova S.I., Kopylova N.K., Borisevich G.V., Androshchuk I.A., Maksimov V.A., Bondarev V.P. [Development of a method for modeling the disease caused by the severe acute respiratory syndrome virus in laboratory animals]. *Molekulyarnaya Meditsina [Molecular Medicine]*. 2009; 5:31–6.
10. Vasil'ev D.A., Lugovtsev V.Yu. [Educational and Methodological Materials for Preparing for Laboratory and Seminar Classes in Virology Course (Part two – Serological Reactions)]. Ulyanovsk; 2005.
11. Sestak K., Scheiners C., Wu X.W., Hollemweguer E. Identification of anti-human CD 1antibodies reactive with rhesus macaque peripheral blood cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007; 1-2:21–6. DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.06.011.
12. Khaydukov S., Baidun L., Zurochka A., Totolyan A.A. [Standardized technology “Study of subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytometers-analyzers”]. *Meditsinskaya Immunologiya [Medical Immunology]*. 2012; 14(3):255–68. DOI: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.
13. Hammerbeck C., Goetz C., Bonnevier J. Primary and secondary antibodies and flow cytometry controls. In: *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert*. Cham: Springer. 2018; P. 75–103. (Cited 10 Dec 2021). [Internet]. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-98071-3_6.
14. Li G., Fan Y., Lai Y., Han T., Li Z., Zhou P., Pan P., Wang W., Hu D., Liu X., Zhang Q., Wu J. Coronavirus infections and immune responses. *J. Med. Virol.* 2020; 4:424–32. DOI: 10.1002/jmv.25685.
15. Gallais F., Velay A., Nazon C., Wendling M.-J., Partisani M., Sibilia J., Candon S., Fafi-Kremer S. Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 associated with cellular immune response without seroconversion. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 1:113–21. DOI: 10.3201/eid2701.203611.
16. Thieme C.J., Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F.S., Hoelzer B., Konik M.J., Berger M.M., Brenner T., Tempfer C., Watzl C., Meister T.L., Pfaender S., Steinmann E., Doff S., Dittmer U., Westhoff T.H., Witzke O., Stervbo U., Roch T., Babel N. Robust T cell response toward spike, membrane, and nucleocapsid SARS-CoV-2 proteins is not associated with recovery in critical COVID-19 patients. *Cell Rep. Med.* 2020; 1:100092. DOI: 10.1016/j.xcrm.2020.100092.
17. Sariol S., Perlman S. Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections. *Immunity*. 2020; 2:248–63. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.07.
18. Yuan X., Huang W., Ye B., Chen C., Huang R., Wu F., Wei Q., Zhang W., Hu J. Changes of hematological and immunological parameters in COVID-19 patients. *Int. J. Hematol.* 2020; 4:553–9. DOI: 10.1007/s12185-020-02930-w.
19. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G., Yuan Z., Feng Z., Zhang Y., Wu Y., Chen Y. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 2020; 11:827. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00827.
20. McMahan K., Yu J., Mercado N.B., Loos C., Tostanoski L.H., Chandrashekar A., Liu J., Peter L., Atyeo C., Zhu A., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., Jacob-Dolan C., Li Z., Nampanya F., Patel S., Pessaint L., van Ry A., Blade K., Yalley-Ogunro J., Cabus M., Brown R., Cook A., Teow E., Andersen H., Lewis M.G., Lauffenburger D.A., Alter G., Barouch D.H. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*. 2021; 590:630–4. DOI: 10.1038/s41586-020-03041-6.
21. Chandrashekar A., Liu J., Martinot A.J., McMahan K., Mercado N.B., Peter L., Tostanoski L.H., Yu J., Maliga Z., Nekorchuk M., Busman-Sahay K., Terry M., Wrijil L.M., Ducat S., Martinez D.R., Atyeo C., Fischinger S., Burke J.S., Slein M.D., Pessaint L., van Ry A., Greenhouse J., Taylor T., Blade K., Cook A., Finneyfrock B., Brown R., Teow E., Velasco J., Zahn R., Wegmann F., Abbink P., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., He X., Jacob-Dolan C., Kordana N., Li Z., Lifton M.A., Mahrokhian S.H., Maxfield L.F., Nityanandam R., Nkolola J.P., Schmidt A.G., Miller A.D., Baric R.S., Alter G., Sorger P.K., Estes J.D., Andersen H., Lewis M.G., Barouch D.H. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science*. 2020; 369:812–7. DOI: 10.1126/science.abc4776.
22. Shi S., Nie B., Chen X., Cai Q., Lin C., Zhao G., Zhang X. Clinical and laboratory characteristics of severe and non-severe patients with COVID-19: A retrospective cohort study in China. *Clin. Lab. Anal.* 2021; 1:e23692. DOI: 10.1002/jcla.23692.
23. Petrova N.V., Ganina K.K., Tarasov S.A. [Susceptibility of laboratory animals to SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus) infection]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2021; 66(2):103–11. DOI: 10.36233/0507-4088-47.
24. Heijmans C.M.C., de Groot N.G., Bontrop R.E. Comparative genetics of the major histocompatibility complex in humans and nonhuman primates. *Int. J. Immunogenet.* 2020; 3:243–60. DOI: 10.1111/iji.12490.
25. Nakayama E., Saijo M. Animal models for Ebola and Marburg virus infections. *Front. Microbiol.* 2013; 4:267. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00267.

Authors:

Borisevich G.V., Kirillova S.L., Shatokhina I.V., Lebedev V.N., Syromyatnikova S.I., Shagarova N.V., Boyarskaya N.V., Levkovich N.G., Solyanik D.A., Andrus A.F., Rubtsov V.V., Krotkov V.T., Kulish V.S., Surovyatkina I.V., Kirillov V.B., Koval'chuk A.V., Pantyukhov V.B., Kutaev D.A., Borisevich S.V. 48th Central Research Institute. 11, Oktyabrskaya St., Sergiev Possad-6, Moscow Region, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mail.ru.

Solov'ev S.S. Scientific Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin. 24, Kashirskoe highway, Moscow, Russian Federation. E-mail: info@ronc.ru.

Об авторах:

Борисевич Г.В., Кириллова С.Л., Шатохина И.В., Лебедев В.Н., Сыромятникова С.И., Шагарова Н.В., Боярская Н.В., Левкович Н.Г., Соляник Д.А., Андрус А.Ф., Рубцов В.В., Кротков В.Т., Кулиш В.С., Суrowяткина И.В., Кириллов В.Б., Ковальчук А.В., Пантюхов В.Б., Кутаев Д.А., Борисевич С.В. 48 Центральный научно-исследовательский институт. Российская Федерация, 141306, Московская обл., Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11. E-mail: 48cnii@mail.ru.

Соловьев С.С. Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина. Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24. E-mail: info@ronc.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-61-69

УДК 616.98:579.842.23

П.А. Горюнова, Г.А. Ерошенко, Л.М. Куклева, Е.А. Нарышкина, Е.А. Соседова,
Н.С. Червякова, В.В. Кутырев

Прикаспийский песчаный природный очаг: филогенетическая история и происхождение штаммов *Yersinia pestis*

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

Цель работы – анализ филогенетического родства и происхождения штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в разные периоды эпизоотической активности Прикаспийского песчаного природного очага (ПППО) чумы в XX–XXI вв. **Материалы и методы.** В работе использованы 40 штаммов *Y. pestis* из ПППО и сопредельных очагов чумы, выделенных в 1922–2015 гг. Проведено полногеномное секвенирование 19 штаммов *Y. pestis* из ПППО. Филогенетический анализ выполнен по данным полногеномного SNP-анализа на основе 1914 выявленных SNPs. Поиск маркерных SNPs выполняли с помощью программы Snippy 4.6. Построение филогенетического дерева осуществляли с использованием алгоритма Maximum Likelihood, модель нуклеотидных замен GTR. **Результаты и обсуждение.** По данным полногеномного SNP-анализа установлено, что штаммы *Y. pestis* средневекового биовара из ПППО относятся к филогенетической линии 2.MED1 и делятся на две основные ветви. Одна из них циркулировала в очаге в первой половине XX в., а другая – во второй половине XX – начале XXI в. Показано, что штаммы первой ветви являлись причиной вспышек и отдельных случаев чумы в ПППО в первой половине XX в. Они близкородственны штаммам из Прикаспийского Северо-Западного степного и Волго-Уральского песчаного природных очагов чумы, которые в этот же период вызывали многочисленные вспышки с высоким процентом летальности. Штаммы *Y. pestis* из ПППО второй половины XX и начала XXI в. относятся ко второй филогенетической ветви линии 2.MED1, в основании которой лежат штаммы из Северного Приаралья 1945 г. Последние были предшественниками всех штаммов, выделенных в ПППО после длительного межэпизоотического периода, произошедшего в середине XX в. Также прослеживается генетическое родство штаммов из ПППО и Дагестанского равнинно-предгорного очага.

Ключевые слова: чума, штаммы, Прикаспийский песчаный природный очаг, филогения *Yersinia pestis*.

Корреспондирующий автор: Горюнова Полина Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Горюнова П.А., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Соседова Е.А., Червякова Н.С., Кутырев В.В. Прикаспийский песчаный природный очаг: филогенетическая история и происхождение штаммов *Yersinia pestis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:61–69. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-61-69

Поступила 30.06.2022. Принята к публ. 21.07.2022.

P.A. Goryunova, G.A. Eroshenko, L.M. Kukleva, E.A. Naryshkina, E.A. Sosedova,
N.S. Chervyakova, V.V. Kutyrev

Caspian Sandy Natural Focus: Phylogenetic History and Origin of *Yersinia pestis* Strains

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

Abstract. The purpose of the work was to analyze the phylogenetic relations and origin of *Yersinia pestis* strains isolated in different periods of epizootic activity of the Caspian sandy natural focus (CSNF) of plague in the XX–XXI centuries. **Materials and methods.** We used 40 *Y. pestis* strains from CSNF and adjacent plague foci, isolated in 1922–2015. Carried out was whole genome sequencing of 19 *Y. pestis* strains from CSNF. Phylogenetic analysis was performed using whole genome SNP analysis based on 1914 identified SNPs. The search for marker SNPs was conducted using the Snippy 4.6 software. The phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood algorithm, the GTR nucleotide substitution model. **Results and discussion.** The whole genome SNP analysis has revealed that *Y. pestis* strains of the medieval biovar from CSNF belong to 2.MED1 phylogenetic lineage and fall into two major branches. One of them circulated in the focus in the first half of the XX century, and the other – in the second half of the XX – early XXI centuries. It is shown that strains of the first branch were the cause of outbreaks and individual cases of plague in the CSNF in the first half of the XX century. They are closely related to strains from the Caspian North-Western steppe and Volga-Ural sandy natural plague foci, which caused numerous outbreaks with high mortality rate in the same period. *Y. pestis* strains from the CSNF of the second half of the XX and early XXI centuries belong to the second phylogenetic branch of the 2.MED1 line, at the node of which the strains from the Northern Aral Sea region of 1945 lay. The latter were the predecessors of all strains isolated in the CSNF after a long inter-epizootic period that occurred in the middle of the XX century. There can also be traced a genetic relation between the strains from CSNF and the Dagestan plain-foothill focus.

Key words: plague, strains, Caspian sandy natural focus, phylogeny of *Yersinia pestis*.

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

Corresponding author: Goryunova Polina Aleksandrovna, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Goryunova P.A., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Sosedova E.A., Chervyakova N.S., Kutyrev V.V. Caspian Sandy Natural Focus: Phylogenetic History and Origin of *Yersinia pestis* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 3:61–69. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-61-69

Received 30.06.2022. Accepted 21.07.2022.

Goryunova P.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6522-2606>
Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>
Kukleva L.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>

Naryshkina E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>
Chervyakova N.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3133-3820>
Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Прикаспийский песчаный природный очаг (ПППО) (43) расположен на территории России в западной части Прикаспийской низменности. Заболевания чумой человека в ПППО известны с 1907 г. Эпидемические проявления регистрировали в очаге в 1923–1924, 1935–1936, 1947–1948 гг. и в 1979 г. Всего чумой заболело 82 человека в 12 населенных пунктах. В современных границах ПППО эпизоотии чумы регистрируют с 1923 г. В последующем они происходили в 1924–1925, 1929–1931, 1935–1938, 1946–1954 гг. [1].

Длительный межэпизоотический период в ПППО начался в 1954 г. и продолжался 25 лет. В 1979 г. отмечена активизация очага, и в последующем, в 1980–2010 гг., эпизоотии чумы происходили здесь ежегодно. В 2011–2012 гг. эпизоотий чумы в очаге не выявлено. После двухлетнего перерыва, осенью 2013 г., в приморской части Прикаспийского песчаного очага изолированы три культуры возбудителя чумы. В 2014–2015 гг. штаммы *Yersinia pestis* выделяли в центральных и восточных районах этого очага. В настоящее время ПППО находится в состоянии депрессии и культуры *Y. pestis* здесь не выделяются [2].

Ранее территория ПППО входила в состав Прикаспийского Северо-Западного степного очага. До 1954 г. большинство культур чумного микроба получали от малых сусликов *Spermophilus pygmaeus* и их специфических блох *Nosopsylla setosa* и *Citellophilus tesquorum*. К 80-м гг. XX в. в связи с возрастанием различий в природных комплексах выделен отдельный – песчаный – очаг чумы. Начиная с 1979 г. возбудитель чумы регистрировали в основном при обследовании полуденной *Meriones meridianus* и гребенщиковой *M. tamariscinus* песчанок, мышевидных грызунов и их блох. Таким образом, в истории ПППО выделяются два разных периода: первой половины XX в. и второй половины XX – начала XXI в. Установлено, что штаммы *Y. pestis*, изолированные в ПППО в современный период от песчанок и их блох, относятся к средневековому биовару основного подвида, филогенетической линии 2.MED1. Это высоковирулентные и эпидемически значимые штаммы [3]. В то же время детальное исследование генетических особенностей штаммов *Y. pestis* из ПППО первой половины XX в. не проводилось. Степень родства штаммов *Y. pestis* из ПППО разных периодов активности очага до сих пор не изучалась, также неясны причины активизации ПППО после длительного межэпизоотического периода середины XX в. Их выяснение важно для выявления закономерностей пространственно-временной циркуляции возбудителя чумы на территории Прикаспийской низменности в XX–XXI вв. и прогнозирования активизации ПППО в дальнейшем.

Цель работы – анализ филогенетического родства и происхождения штаммов *Y. pestis*, выделенных в разные периоды эпизоотической активности Прикаспийского песчаного природного очага чумы в XX–XXI вв.

Материалы и методы

Штаммы *Y. pestis*, условия культивирования, определение биохимических характеристик. Искользованные в работе штаммы *Y. pestis* получены из Государственной коллекции патогенных бактерий на базе Российского противочумного института «Микроб». Штаммы *Y. pestis* выращивали при температуре 28 °C в течение 24–48 ч на агаре LB и в бульоне LB. Анализ культурально-морфологических и биохимических свойств штаммов *Y. pestis* проводили в соответствии со стандартными методами лабораторной диагностики. Ферментацию глицерина, рамнозы, мелибиозы и арабинозы изучали на средах Гисса (1 % пептонная вода, 0,5 % хлорид натрия, 1 % индикатор Андрее, pH 7,2), включавших 1 % соответствующих субстратов. Для выявления денитрифицирующей активности использовали бульон LB с 0,1 % нитратом калия с последующим добавлением реагента Грисса. Малиновое окрашивание среды указывало на наличие соответствующей активности [4].

Полногеномное секвенирование, идентификация SNPs, построение дендрограмм. Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* проводили с помощью набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США). Полногеномное секвенирование выполняли с помощью Ion S5 XL System (Thermo Fischer Scientific) согласно инструкции производителя. Для обработки данных использовали Ion Torrent Suite software package 3.4.2 и Newbler gsAssembler 2.6. SNPs выявляли путем выравнивания контигов штаммов на геноме CO92, при помощи программы Snippy 4.6, с последующим удалением 28 гомоплазий SNPs [5]. Полученный набор SNPs содержал только коровую область генома. Дендрограмму Maximum Likelihood строили с использованием программы PHYL-3.1. Подбор модели нуклеотидных замещений проводили в программе jMODELTEST 2.1.7 [6], в результате определена модель GTR (Bootstrap – 500).

Результаты и обсуждения

В работе использованы 40 штаммов *Y. pestis* из ПППО и сопредельных очагов чумы. Из ПППО изучено 23 штамма, в том числе 7 штаммов первой половины XX в. Последние получены от малого суслика *S. pygmaeus* (2 штамма), верблюда (1 штамм) и людей (4 штамма). Штаммы *Y. pestis* второй по-

ловины XX – начала XXI в. выделены от полуденной *M. meridianus* (12 штаммов) и гребенщиковой *M. tamariscinus* (2 штамма) песчанок, малого суслика *S. pygmaeus* (1 штамм), блох (1 штамм). Места и источники выделения штаммов *Y. pestis* указаны в табл. 1. Проведено полногеномное секвенирование 19 штаммов из ПППО за период 1930–2015 гг.

Фенотипический анализ штаммов *Y. pestis*, выделенных в ПППО в первой половине XX в. и во второй половине XX – начале XXI в., показал, что все они обладали типичной для штаммов средне-

векового биовара биохимической активностью: не ферментировали рамнозу и мелибиозу, ферментировали арабинозу и глицерин, неспособны к редукции нитратов.

Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы. Для проведения филогенетического анализа использованы нуклеотидные последовательности 23 штаммов *Y. pestis* из ПППО, а также последовательности 17 штаммов из сопредельных очагов Северного Прикаспия, Предкавказья и Северного Приаралья,

Таблица 1 / Table 1

Штаммы *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы, использованные в работе
***Y. pestis* stains from the Precaspian sandy and adjacent plague foci, used in this study**

Штамм Strain	Природный очаг, место выделения Natural focus, site of isolation	Источник, год Source, year
1	2	3
258	Прикаспийский песчаный, г. Астрахань Caspian sandy, Astrakhan	человек, 1930 human, 1930
177	Прикаспийский песчаный, Ставропольский край, с. Мирное Caspian sandy, Stavropol Territory, Mirnoe village	человек, 1933 human, 1933
469	Прикаспийский песчаный, Ставропольский край, Левокумский р-н Caspian sandy, Stavropol Territory, Levokumsky district	<i>S. pygmaeus</i> , 1935
226	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия, с. Нарын Худук Caspian sandy, Republic of Kalmykia, Naryn Khuduk village	человек, 1936 human, 1936
228	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия, с. Нарын Худук Caspian sandy, Republic of Kalmykia, Naryn Khuduk village	человек, 1936 human, 1936
248	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия, с. Нарын Худук Caspian sandy, Republic of Kalmykia, Naryn Khuduk village	верблюд, 1936 camel, 1936
664	Прикаспийский песчаный, Астраханская обл. Caspian sandy, Astrakhan Region	<i>S. pygmaeus</i> , 1946
М-593	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия, Черноземельский р-н Caspian sandy, Republic of Kalmykia, Chernozemelsky district	<i>M. meridianus</i> , 1979
М-635	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия, ст. Артезиан Caspian sandy, Republic of Kalmykia, Artezian station	<i>M. meridianus</i> , 1980
М-690	Прикаспийский песчаный, Астраханская обл. Caspian sandy, Astrakhan Region	<i>S. pygmaeus</i> , 1980
М-768	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия, Приморский р-н Caspian sandy, Republic of Kalmykia, Primorsky district	<i>M. meridianus</i> , 1983
М-821	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия, Черноземельский р-н Caspian sandy, Republic of Kalmykia, Chernozemelsky district	<i>M. meridianus</i> , 1985
М-871	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия, Каспийский р-н, Caspian sandy, Republic of Kalmykia, Caspian region	<i>M. meridianus</i> , 1987
М-972	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия, Каспийский р-н Caspian sandy, Republic of Kalmykia, Caspian region	<i>M. meridianus</i> , 1990
С-748	Прикаспийский песчаный, Республика Дагестан, ст. Бирюзак Caspian sandy, Republic of Dagestan, Biryuzak station	<i>M. meridianus</i> , 1999
С-755	Прикаспийский песчаный, Республика Дагестан, Ногайский р-н Caspian sandy, Republic of Dagestan, Nogai district	<i>M. meridianus</i> , 1999
М-1268	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия, Черноземельский р-н Caspian sandy, Republic of Kalmykia, Chernozemelsky district	<i>N. laeviceps</i> , 2001
С-789	Прикаспийский песчаный, Республика Дагестан, Ногайский р-н Caspian sandy, Republic of Dagestan, Nogai district	<i>M. tamariscinus</i> , 2003
М-1814	Прикаспийский песчаный, Астраханская область, Лиманский р-н Caspian sandy, Astrakhan Region, Limansky district	<i>M. tamariscinus</i> , 2006
М-1864	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия Caspian sandy, Republic of Kalmykia	<i>M. meridianus</i> , 2009

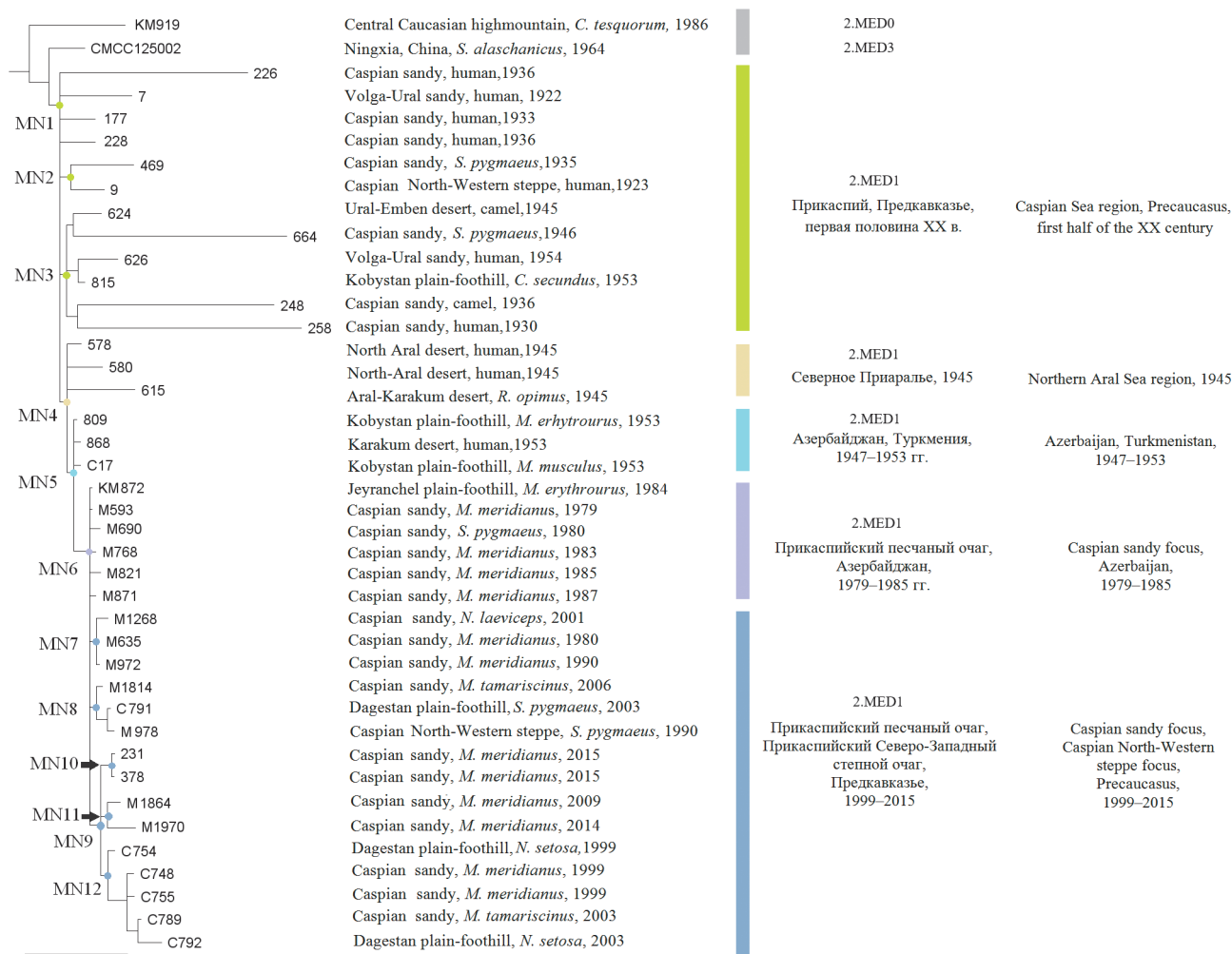
Окончание табл. 1 / Ending of table 1

1	2	3
M-1970	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия, Лаганский р-н Caspian sandy, Republic of Kalmykia, Lagansky district	<i>M. meridianus</i> , 2014
231	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия, Черноземельский р-н Caspian sandy, Republic of Kalmykia, Chernozemelsky district	<i>M. meridianus</i> , 2015
378	Прикаспийский песчаный, Республика Калмыкия, Черноземельский р-н Caspian sandy, Republic of Kalmykia, Chernozemelsky district	<i>M. meridianus</i> , 2015
KM 919	Центрально-Кавказский высокогорный, Кабардино-Балкарская Республика Central Caucasian high-mountain, Kabardino-Balkaria	<i>C. tesquorum</i> , 1986
C-754	Дагестанский равнинно-предгорный, Республика Дагестан, с. Герменчик Dagestan plain-foothill, Republic of Dagestan, Germenchik village	<i>N. setosa</i> , 1999
C-791	Дагестанский равнинно-предгорный, Республика Дагестан Dagestan plain-foothill, Republic of Dagestan	<i>S. pygmaeus</i> , 2003
C-792	Дагестанский равнинно-предгорный, Республика Дагестан, Dagestan plain-foothill, Republic of Dagestan	<i>N. setosa</i> , 2003
809	Кобыстанский равнинно-предгорный, Азербайджан Kobystan plain-foothill, Azerbaijan	<i>M. erhytrourus</i> , 1953
815	Кобыстанский равнинно-предгорный, Азербайджан Kobystan plain-foothill, Azerbaijan	<i>C. secundus</i> , 1953
C-17	Кобыстанский равнинно-предгорный, Азербайджан Kobystan plain-foothill, Azerbaijan	<i>M. musculus</i> , 1953
KM 872	Джейранчельский равнинно-предгорный, Азербайджан, г. Мулсартане Jeyranchel plain-foothill, Azerbaijan, Mulsartane city	<i>M. erythrourus</i> , 1984
9	Прикаспийский Северо-Западный степной, Ростовская обл., с. Качкино Caspian North-Western steppe, Rostov Region, Kachkino village	человек, 1923 human, 1923
M-978	Прикаспийский Северо-Западный степной, Республика Калмыкия Caspian North-Western steppe, Republic of Kalmykia	<i>S. pygmaeus</i> , 1990
7	Волго-Уральский песчаный, Западный Казахстан, ур. Каныш-Чагал Volga-Ural sandy, Western Kazakhstan, Kanysh-Chagal tract	человек, 1922 human, 1922
626	Волго-Уральский песчаный, Западный Казахстан, Гурьевская обл. Volga-Ural sandy, Western Kazakhstan, Guriyev Region	человек, 1954 human, 1954
624	Урало-Эмбенский пустынный, Казахстан, Гурьевская обл. Ural-Emben desert, Kazakhstan, Guriyev Region	верблюд, 1945 camel, 1945
578	Северо-Приаральский пустынный, Казахстан, Аральский р-н North Aral desert, Kazakhstan, Aral district	человек, 1945 human, 1945
580	Северо-Приаральский пустынный, Казахстан, Аральский р-н North-Aral desert, Kazakhstan, Aral district	человек, 1945 human, 1945
615	Приаральско-Каракумский пустынный, Казахстан, Кызыл-Ординская обл. Aral-Karakum desert, Kazakhstan, Kzyl-Ordinsk Region	<i>R. opimus</i> , 1945
868	Каракумский пустынный, Туркмениния Karakum desert, Turkmenistan	человек, 1953 human, 1953

включая 1 штамм из Центрально-Кавказского высокогорного, 3 – из Дагестанского равнинно-предгорного, 3 – из Кобыстанского равнинно-предгорного, 1 – из Джейранчельского равнинно-предгорного, 2 – из Прикаспийского Северо-Западного степного, 2 – из Волго-Уральского песчаного, 2 – из Северо-Приаральского пустынного, 1 – из Урало-Эмбенского пустынного, 1 – из Приаральско-Каракумского пустынного, 1 штамм из Каракумского пустынного природных очагов чумы (табл. 1, рисунок). В филогенетический анализ включены также штаммы других филогенетических линий из разных очагов мира, последовательности которых представлены в базе данных NCBI GenBank. К ним относятся следующие геномы: 620024 (номер доступа NZ_ADPM000000000.1), *Pestoides F* (№ NC_009381.1),

Pestoides A (№ NZ_ACNT000000000.1), C092 (№ NC_003143.1), 351001 (№ NZ_ADPF000000000.1), CMCC125002 (№ ADQN000000000.1). Данные по ним на рисунке не приводятся для улучшения наглядности филогенетического дерева средневекового биовара. Дендрограмма построена на основе полногеномного SNP-анализа 46 штаммов *Y. pestis* (рисунок).

Сравнительный филогенетический анализ на основе выявленных 1914 коровых SNPs показал, что все исследованные штаммы *Y. pestis* из ПППО, выделенные за период с 1930 по 2015 год, принадлежат к филогенетической линии 2.MED1 средневекового биовара, включая штаммы первой половины XX в. (рисунок). На дендрограмме штаммы из ПППО разделились на две обособленные филогенетические ветви линии 2.MED1: первой половины XX в. (штам-



Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы по данным полногеномного SNP-анализа. Дендрограмма Maximum likelihood на основе 1914 SNPs построена с помощью PHYLML 3.1, модели GTR, 500 бутстрэп-реплик

Phylogenetic analysis of *Y. pestis* strains from the Caspian sandy and adjacent plague foci according to the results of whole genome SNP-analysis. Maximum likelihood dendrogram is constructed based on 1914 SNPs using PHYLML 3.1, GTR model, 500 bootstrap replicates

мы 226, 177, 228, 469, 664, 248, 258; 1930–1946 гг.) и второй половины XX – начала XXI в. (16 штаммов; 1979–2015 гг.). Из первых семи штаммов четыре получены от человека, что доказывает участие штаммов 2.MED1 во вспышках и отдельных случаях чумы в ПППО, как это было ранее показано и для очагов Северо-Западного и Северного Прикаспия [7].

Эта заболеваемость в ПППО связана с первой волной распространения линии 2.MED1 в начале прошлого века, когда штаммы средневекового биовара основного подвида филогенетической ветви 2.MED1 являлись этиологическим агентом вспышек с высоким показателем летальности в Прикаспии. В этот же период штаммы 2.MED1 циркулировали и в ПППО. Они выделялись как от больных, так и от носителей, что доказывает их укоренение в природном биоценозе этого очага. Штаммы 2.MED1 циркулировали здесь до 1954 г., до наступления длительного межэпизоотического периода, который, по-видимому, был вызван резким падением уровня Каспийского моря в середине XX столетия и после-

довавшими изменениями природного биоценоза со сменой основного носителя чумы в ПППО. Начало проявления активности очага после 1979 г., возможно, связано со значительным подъемом уровня Каспия.

Как следует из рисунка, штаммы первой половины прошлого века из ПППО имели общее происхождение со штаммами из очагов чумы Северо-Западного и Северного Прикаспия первой половины XX в. (рисунок, узел MN1; табл. 2). В составе этой ветви 2.MED1 первой половины XX в. выделяются как единичные, отходящие от общего ствола штаммы, так отдельные кластеры. Единичные штаммы получены от людей в ПППО (штаммы 177, 226 и 228; 1933–1936 гг.) и Волго-Уральском песчаном очаге (штамм 7; 1922 г.). Один из кластеров содержит штамм 469 (*S. pygmaeus*, 1935 г.) из ПППО и штамм 9 (человек, 1923 г.) из Прикаспийского Северо-Западного степного очага (рисунок, узел MN2; табл. 2). Второй кластер включает 1 штамм из Волго-Уральского песчаного, 1 – Урало-Эмбенского

Таблица 2 / Table 2

SNPs, маркерные для филогенетических узлов дендрограммы (рисунок) штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы, использованных в работе

SNPs marker for phylogenetic nodes of the dendrogram (Figure) of *Y. pestis* strains from the Precaspian sandy and adjacent plague foci, used in this study

Узел Node	Координаты SNP по геному CO92 SNP position across the genome CO92	Замена нуклеотида Nucleotide substitution	Ген Gene	Кодируемый продукт Encoded product
1	2	3	4	5
MN1	252309	C → T	<i>acs</i>	ацетат-КоА лигаза acetate--CoA ligase
	449523	C → A	<i>rimI</i>	рибосомальный белок S18-аланил-N-трансфераза ribosomal protein S18-alanine N-acetyltransferase
	568345	A → T	<i>sgrR</i>	регулятор транскрипции HTH-типа SgrR HTH-type transcriptional regulator SgrR
	1261149	C → T	intergenic	NA
	1561394	G → A	intergenic	NA
	1586141	C → T	<i>cmoM</i>	тРНК уридин 5-оксиуксусная кислота(34) метилтрансфераза CmoM tRNA uridine 5-oxyacetic acid(34) methyltransferase CmoM
	1996390	C → T	YPO_RS09745	белок S-box домена PAS PAS domain S-box protein
	2444694	C → A	intergenic	NA
	3030163	C → T	YPO_RS14495	белок, содержащий DUF979 домен DUF979 domain-containing protein
	3470222	G → A	<i>rfbH</i>	липополисахарид-связывающий белок RfbH lipopolysaccharide-binding protein RfbH
	3551475	G → A	<i>secD</i>	белковая субъединица транслоказы SecD protein translocase subunit SecD
	3596834	G → A	<i>dinB</i>	ДНК-полимераза IV DNA polymerase IV
	3805148	C → A	intergenic	NA
	3869550	C → A	<i>phnL</i>	белок фосфонат-CP-лиазной системы PhnK phosphonate CP lyase system protein PhnL
	4104673	C → T	YPO_RS19375	белок, содержащий DUF2570 домен DUF2570 domain-containing protein
	4258899	C → A	YPO_RS20045	sn-глицерол-3-фосфат-АТФ-связывающий белок UgpC sn-glycerol-3-phosphate-ATP-binding protein UgpC
	4287044	G → T	YPO_RS20180	цинк/кадмий/ртуть/свинец-транспортирующая АТФаза zinc/cadmium/mercury/lead-transporting ATPase
MN2	394518	G → A	<i>nsrR</i>	NO-чувствительный репрессор NsrR nitric oxide-sensing repressor NsrR
	3760283	C → T	<i>cysJ</i>	субъединица флавопротеина ассимиляционной NADPH-сульфитредуктазы assimilatory NADPH-dependent sulfite reductase flavoprotein subunit
MN3	3395230	C → A	YPO_RS16180	белок-регулятор ответа response regulating protein
MN4	739446	C → T	YPO_RS04355	гипотетический белок hypothetical protein
MN5	512182	G → T	<i>carA</i>	малая субъединица карбамоилфосфатсинтазы, гидролизующая глутамин glutamine-hydrolyzing carbamoyl-phosphate synthase small subunit
MN6	790023	C → T	<i>flgK</i>	крюк-ассоциированный белок FlgK flagellar hook-associated protein FlgK
	1399276	A → G	YPO_RS07200	гипотетический белок hypothetical protein
	1784776	C → T	YPO_RS08810	белок семейства DCC тиол-дисульфид оксидоредуктазы thiol-disulfide oxidoreductase DCC-family protein
MN7	666854	G → T	intergenic	NA

Окончание табл. 2 / Ending of table 2

1	2	3	4	5
MN8	2448252	C → T	<i>hns</i>	ДНК-связывающий регулятор транскрипции H-NS DNA-binding transcription regulator H-NS
	3739402	C → A	YPO_RS17715	эритритол/L-треитол дегидрогеназа erythritol/L-threitol dehydrogenase
MN9	300402	G → T	intergenic	NA
	1687465	T → G	<i>tssG</i>	субъединица базовой пластины системы секреции VI типа TssG type VI secretion system baseplate subunit TssG
MN10	63229	C → T	<i>mutM</i>	бифункциональная ДНК-формамидопиримидин гликозилаза/ДНК-лиаза bifunctional DNA-formamidopyrimidine glycosylase/DNA-lyase
MN11	559860	C → A	intergenic	NA
MN12	2277898	T → A	YPO_RS11020	белок, содержащий DUF4087 домен DUF4087 domain-containing protein

Примечание: NA – неизвестно.

Note: NA – not available.

пустынного, 1 – Кобыстанского равнинно-предгорного и 3 – ПППО (664, *S. pygmaeus*, 1946 г.; 258, человек, 1930 г.; 248, верблюд, 1936 г.) (рисунок, узел MN3; табл. 2). Таким образом, из полученных данных следует, что штаммы из ПППО первой половины XX в. принадлежали к филогенетической линии 2.MED1, вызвали чуму у людей, близкородственны штаммам из Северо-Западного и Северного Прикаспия и получили распространение в ПППО в период первой волны 2.MED1 средневекового био-вара в Прикаспии в начале XX в.

Из данных дендрограммы филогенетических связей следует, что штаммы, которые стали выделять в ПППО после 1979 г., не являются прямыми потомками штаммов ветви 2.MED1, которые были распространены здесь в первой половине XX в. Они потомки штаммов *Y. pestis* другой, образовавшейся позже ветви линии 2.MED1, которая в середине XX в. укоренилась в Северном Приаралье (рисунок, узел MN4; табл. 2) и впоследствии вновь достигла Прикаспийского региона, включая ПППО, на фоне благоприятных климатических изменений [8]. Возобновление активности очага совпадает с образованием политомии на филогенетическом дереве *Y. pestis*, на стволе которой вначале расположились единичные штаммы 2.MED1 из ПППО периода 1979–1985 гг. (рисунок, узел MN6; табл. 2). Все они отличаются набором уникальных SNPs, не встречающихся у других штаммов из этого природного очага. Эти штаммы выделены на относительно недалеких друг от друга участках ПППО в Черноземельском и Приморском районах Республики Калмыкия и Астраханской области.

Дальнейшая эволюция возбудителя на территории очага привела к образованию отдельных кластеров конца XX – начала XXI в. Первый кластер образован штаммом М-1814 (*M. tamariscinus*, 2006 г.) из ПППО, М-978 (*S. pygmaeus*, 1990 г.) из Прикаспийского Северо-Западного степного и С-791 (*S. pygmaeus*, 2003 г.) из Дагестанского равнинно-

предгорного очага чумы (рисунок, узел MN7; табл. 2). Штамм М-1814 филогенетически близок двум штаммам: С-791 и М-978, – несмотря на то, что все они выделены на значительном расстоянии друг от друга.

Второй кластер состоит из трех штаммов: М-635 (*M. meridianus*, 1980 г.), М-972 (*M. meridianus*, 1990), М-1268 (*N. laeviceps*, 2001 г.), – изолированных на территории ПППО на Черных землях и в Ильменном районе Республики Калмыкия от полуденных песчанок и их блох (рисунок, узел MN8; табл. 2). Территориально штаммы выделены недалеко друг от друга, что объясняет их принадлежность к одному филогенетическому кластеру. В третий кластер вошли современные штаммы, изолированные на территории ПППО и Дагестанского равнинно-предгорного природного очага в 1999–2015 гг. (рисунок, узел MN9; табл. 2). Он представлен тремя подкластерами, отходящими от филогенетического дерева в узлах MN10, MN11 и MN12. В первый подкластер входят два штамма: 231 и 378 (рисунок, узел MN10; табл. 2). Они получены от *M. meridianus* в 2015 г. в ПППО в районе Черные земли, что объясняет их филогенетическую близость и принадлежность к одному подкластеру. Второй подкластер представлен штаммами М-1864 (*M. meridianus*, 2009 г.) и М-1970 (*M. meridianus*, 2015 г.) (рисунок, MN11, табл. 2). Эти штаммы выделены на территории ПППО в Республике Калмыкия. Третий подкластер образован пятью штаммами из очагов чумы Прикаспия и Предкавказья (рисунок, MN12; табл. 2). В его основании лежит штамм С-754 (*N. setosa*, 1999 г.), выделенный на территории Дагестанского равнинно-предгорного очага. От него отходит группа штаммов, изолированных от носителей и переносчиков в 1999–2003 гг. в ПППО и Дагестанском равнинно-предгорном очаге.

Распространение волны 2.MED1 во второй половине XX в. из Северного Приаралья не сопровождалось вспышками заболеваемости и значительными изменениями генома, но привело к укоренению

штаммов в природном биоценозе ПППО. Одним из возможных направлений проникновения штаммов *Y. pestis* из Северного Приаралья (1945 г.) в ПППО мог быть путь через Каспийское море в Кобыстанский равнинно-предгорный очаг, а оттуда в ПППО, так как промежуточная ветвь на дендрограмме между штаммами из Северного Приаралья (1945 г.) и ПППО (1980–2015 гг.) включает преимущественно штаммы из Кобыстанского очага 1953 г. (рисунок, узел MN5; табл. 2). Из дендрограммы также следует, что в 1990–2003 гг. штаммы из ПППО уже достигли Прикаспийского Северо-Западного степного и Дагестанского равнинно-предгорного очагов чумы.

Таким образом, штаммы *Y. pestis*, выделенные в ПППО в XX–XXI вв., относятся к филогенетической линии 2.MED1 средневекового биовара основного подвида *Y. pestis*. Штаммы этой линии широко представлены в природных очагах Восточной Европы, Центральной и Восточной Азии [8–10].

По данным проведенного филогенетического анализа, они делятся на две ветви. Одна из них циркулировала в очаге в первой половине XX в., а вторая – во второй половине XX – начале XXI в. Из анализа комплекса филогенетических, эпидемиологических и эпизоотологических данных следует, что штаммы, которые были распространены в ПППО в начале XX в., близкородственны штаммам из Прикаспийского Северо-Западного степного и Волго-Уральского песчаного природных очагов чумы. Это были эпидемически значимые штаммы, которые являлись этиологическими агентами вспышек и отдельных случаев чумы на территории очага в первой половине XX в. Для штаммов этого периода, выделенных от людей, основных и случайных носителей, характерна высокая скорость эволюции и большое число единичных полиморфизмов SNPs. Штаммы *Y. pestis* второй половины XX и начала XXI в. образовали вторую ветвь, в основании которой находятся штаммы из Северного Приаралья. Последние были предшественниками всех штаммов, выделенных в ПППО после длительного межэпизоотического периода, наступившего в середине XX в. Следует отметить, что наступление межэпизоотического периода в ПППО сопровождалось исчезновением штаммов *Y. pestis*, распространенных здесь в первой половине XX в. Активизация ПППО после 1979 г. явилась следствием распространения в ПППО более поздней ветви линии 2.MED1 из Северного Приаралья, достигшей ПППО на фоне сложившихся благоприятных изменений климата и повышения уровня Каспийского моря. Также прослеживается генетическое родство штаммов из ПППО со штаммами из Предкавказья, в частности из Дагестанского равнинно-предгорного очага.

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

Список литературы

1. Кутырев В.В., Попова А.Ю., редакторы. Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 год). Саратов: Амрит; 2016. 248 с.
2. Попов Н.В., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Сафронов В.А., Поршаков А.М., Иванова А.В., Марцоха К.С., Корзун В.М., Вержудский Д.Б., Чипанин Е.В., Лопатин А.А., Дубянский В.М., Ашибокоев У.М., Газиева А.Ю., Зенкевич Е.С., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Совершенствование эпидемиологического надзора в природных очагах чумы Российской Федерации и прогноз их эпизоотической активности на 2022 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 1:35–42. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-35-42.
3. Павлова А.И., Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Анализ генетической изменчивости штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы Российской Федерации и Монголии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; 4:49–53. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-4-49-53.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Шико; 2013. 560 с.
5. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 2:577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
6. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 2012; 8:772. DOI: 10.1038/nmeth.2109.
7. Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Альхова Ж.В., Балыкова А.Н., Куклева Л.М., Червякова Н.С., Майканов Н.С., Сармулдина А.Х., Кутырев В.В. Пространственно-временной анализ циркуляции *Yersinia pestis* в Волго-Уральском песчаном очаге. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:51–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-51-5.
8. Eroshenko G.A., Popov N.V., Al'khova Z.V., Kukleva L.M., Balykova A.N., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Kutyrev V.V. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th–21st centuries. *PLoS One*. 2021; 2:e0244615. DOI: 10.1371/journal.pone.0244615.
9. Li J., Wang Y., Liu F., Shen X., Wang Y., Fan M., Peng Y., Wang S., Feng Y., Zhang W., Lv., Zhang H., Lu X., Zhang E., Wei J., Chen L., Kan B., Zhang Z., Xu J., Wang W., Li W. Genetic source tracking of human plague cases in Inner Mongolia-Beijing, 2019. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 8:e0009558. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009558.
10. Xu L., Stige L.C., Leirs H., Neerinx S., Gage K.L., Yang R., Liu Q., Bramanti B., Dean K.R., Tang H., Sun Z., Stenseth N.C., Zhang Z. Historical and genomic data reveal the influencing factors on global transmission velocity of plague during the Third Pandemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019; 24:11833–8. DOI: 10.1073/pnas.1901366116.

References

1. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., editors. [Cadastre of Epidemic and Epizootic Plague Manifestations in the Territory of the Russian Federation and Former Soviet Union Countries (1876–2016)]. Saratov: LLC "Amrit"; 2016. 248 p.
2. Popov N.V., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Safronov V.A., Porshakov A.M., Ivanova A.V., Martsokha K.S., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Chipanin E.V., Lopatin A.A., Dubyansky V.M., Ashibokov U.M., Gazieva A.Yu., Zenkevich E.S., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kutyrev V.V. [Enhancement of epidemiological surveillance in natural plague foci of the Russian Federation and forecast of epizootic activity for 2022]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (1):35–42. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-35-42.
3. Pavlova A.I., Eroshenko G.A., Odiokov G.N., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Krasnov Y.M., Kutyrev V.V. [Analysis of genetic variability of *Yersinia pestis* strains (medieval biovar) isolated in natural plague foci of the Russian Federation and Mongolia]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2012; (4):49–53. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-4-49-53.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: CJSC "Shiko"; 2013. 560 p.
5. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang

H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 2:577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.

6. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModel-Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 2012; 8:772. DOI: 10.1038/nmeth.2109.

7. Eroshenko G.A., Popov N.V., Al'khova Z.V., Balykova A.N., Kukleva L.M., Chervyakova N.S., Maykanov N.S., Sarmuldina A.K., Kuttyrev V.V. [Circulation of *Yersinia pestis* in the Volga-Ural sandy focus: spatiotemporal analysis]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (3):51–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-51-57.

8. Eroshenko G.A., Popov N.V., Al'khova Z.V., Kukleva L.M., Balykova A.N., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Kuttyrev V.V. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th–21st centuries. *PLoS One*. 2021; 2:e0244615. DOI: 10.1371/journal.pone.0244615.

9. Li J., Wang Y., Liu F., Shen X., Wang Y., Fan M., Peng Y., Wang S., Feng Y., Zhang W., Lv, Zhang H., Lu X., Zhang E., Wei J., Chen L., Kan B., Zhang Z., Xu J., Wang W., Li W. Genetic source tracking of human plague cases in Inner Mongolia-Beijing, 2019.

PLoS Negl. Trop. Dis. 2021; 8:e0009558. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009558.

10. Xu L., Stige L.C., Leirs H., Neerinx S., Gage K.L., Yang R., Liu Q., Bramanti B., Dean K.R., Tang H., Sun Z., Stenseth N.C., Zhang Z. Historical and genomic data reveal the influencing factors on global transmission velocity of plague during the Third Pandemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019; 24:11833–8. DOI: 10.1073/pnas.1901366116.

Authors:

Goryunova P.A., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Sosedova E.A., Chervyakova N.S., Kuttyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Горюнова П.А., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Соседова Е.А., Червякова Н.С., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-70-74

УДК 664:614.31

Ю.В. Гуляев¹, В.П. Мещанов², Б.М. Кац², Н.А. Коплевацкий², А.А. Лопатин², К.А. Саяпин²,
В.А. Ёлкин², В.В. Комаров^{2,3}, В.Б. Байбури^{2,3}, А.П. Рытик⁴

Воздействие импульсным СВЧ-излучением на образцы пищевой продукции с целью увеличения показателей ее микробиологической безопасности и сроков хранения

¹ФГБУН «Институт радиотехники и электроники имени В.А. Котельникова» РАН, Москва, Российская Федерация;

²ООО «Научно-производственное предприятие «НИКА-СВЧ», Саратов, Российская Федерация;

³ФГБОУ «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.», Саратов, Российская Федерация;

⁴ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Саратов, Российская Федерация

Цель – исследование эффективности обеззараживания биологических материалов и сред (на примере пищевой продукции) путем воздействия импульсного (нетеплового) радиоизлучения и анализ перспектив его применения в медицине и биологии. **Материалы и методы.** Для достижения поставленной цели разработана, изготовлена и испытана экспериментальная установка, позволяющая проводить исследования процессов воздействия импульсного (нетеплового) радиоизлучения на биологические материалы и среды, в частности на примере пищевой продукции. В основе метода лежит идея оптимального управления электрофизическими параметрами облучающего радиосигнала в зависимости от типа облучаемого объекта. Для облучения использованы импульсные магнетроны с рабочей частотой $(2,45 \pm 0,05)$ ГГц, разрешенной для медико-биологических исследований, генерирующие импульсное излучение с регулируемой мощностью в интервале 0,1...10 кВт. Частота следования импульсов со скважностью 500...10000 составляет 0,1...5 кГц. Установка имеет рабочую камеру, в которой размещается испытуемый образец, а также дополнительные элементы защиты магнетрона и устройства измерения параметров падающей на биологический объект СВЧ-мощности. **Результаты и обсуждение.** Установка успешно использована для облучения импульсным СВЧ-сигналом различных образцов пищевых материалов с патогенной микрофлорой (*Salmonella* spp. и др.). В частности, как показали проведенные исследования, после 28 суток хранения мясного фарша среднее арифметическое значение количества болезнетворных бактерий в облученных образцах оказалось в 27,5 раза меньше, чем в необлученных. Предварительно проведенные эксперименты в области изучения влияния импульсного СВЧ-излучения на процесс деления клеток и другие аспекты воздействия электромагнитного поля на патогенные микроорганизмы подтверждают их перспективность и целесообразность продолжения начатых экспериментов в медицине и биологии.

Ключевые слова: электромагнитные импульсы, обеззараживание, вирусы, патогенные микроорганизмы.

Корреспондирующий автор: Мещанов Валерий Петрович, e-mail: nika373@bk.ru.

Для цитирования: Гуляев Ю.В., Мещанов В.П., Кац Б.М., Коплевацкий Н.А., Лопатин А.А., Саяпин К.А., Ёлкин В.А., Комаров В.В., Байбури В.Б., Рытик А.П. Воздействие импульсным СВЧ-излучением на образцы пищевой продукции с целью увеличения показателей ее микробиологической безопасности и сроков хранения. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 3:70–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-70-74

Поступила 29.12.2021. Отправлена на доработку 04.04.2022. Принята к публ. 11.05.2022.

Yu.V. Gulyaev¹, V.P. Meshchanov², B.M. Kats², N.A. Koplevatsky², A.A. Lopatin², K.A. Sayapin²,
V.A. Elkin², V.V. Komarov^{2,3}, V.B. Bayburin^{2,3}, A.P. Rytik⁴

Exposure of Food Samples to Pulsed Microwave Radiation to Increase their Microbiological Safety and Shelf Life

¹Institute of Radio Engineering and Electronics named after V.A. Kotelnikov of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

²Research and Production Enterprise “NIKA-SVCh”, Ltd., Saratov, Russian Federation;

³Saratov State Technical University named after Gagarin Yu.A., Saratov, Russian Federation;

⁴Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevsky, Saratov, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to increase the efficiency of decontamination of biological material and media (by the example of food products) by pulsed (non-thermal) radio emission and assess the prospects of its application in medicine and biology. **Materials and methods.** To achieve the goal an experimental setup has been designed, manufactured and tested, which makes it possible to study the process of exposure of biological materials and media to pulsed (non-thermal) radio emission, in particular, by the example of food products. The basis of the method is optimum control of the electro-physical parameters of the irradiating radio signal, depending on the type of the irradiated object. We used pulsed magnetrons with operating frequency of (2.45 ± 0.05) GHz, authorized for bio-medical research, generating pulsed radiation with an adjustable power within the range of 0.1...10 kW. The pulse repetition rate with a duty cycle of 500...10000 is 0.1...5 kHz. The setup has an operating chamber into which the test sample is placed, as well as additional elements of magnetron protection and measuring the parameters of the microwave power incident on biological object. **Results and discussion.** The setup has been successfully used to irradiate various food samples with pathogenic microflora (*Salmonella* spp. etc.) with pulsed microwave radiation. In particular, as shown by the studies, the arithmetic mean number of pathogenic bacteria in the irradiated samples of minced meat decreased by 27.5 times after 28 days of storage as compared to the control group of non-irradiated samples. Preliminary conducted experiments in the field of investigat-

ing the effect of microwave radiation on the process of cell division and other aspects of electromagnetic field influence on pathological microorganisms confirm the prospects and the expediency of continuing the ongoing studies in medicine and biology.

Key words: electromagnetic pulses, decontamination, viruses, pathogenic microorganisms.

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

Corresponding author: Valery P. Meshchanov, e-mail: nika373@bk.ru.

Citation: Gulyaev Yu.V., Meshchanov V.P., Kats B.M., Koplevatsky N.A., Lopatin A.A., Sayapin K.A., Elkin V.A., Komarov V.V., Bayburin V.B., Rytik A.P. Exposure of Food Samples to Pulsed Microwave Radiation to Increase their Microbiological Safety and Shelf Life. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:70–74. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-70-74

Received 29.12.2021. Revised 04.04.2022. Accepted 11.05.2022.

Gulyaev Yu.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4401-9275>
 Meshchanov V.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7863-4631>
 Kats B.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2666-8538>
 Koplevatsky N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2173-3150>
 Lopatin A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2911-4055>

Sayapin K.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6960-7183>
 Komarov V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2345-086X>
 Bayburin V.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2056-3516>
 Rytik A.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2911-4055>

Внимание российских и зарубежных ученых уже около ста лет привлекает исследование возможностей использования электромагнитного излучения в различных областях науки и техники: биологии, физике, медицине, химии, сельском хозяйстве, производстве строительных материалов, пищевой промышленности и т.д.

Существуют два основных вида (типа) воздействия электромагнитного излучения на объекты исследования: тепловое (облучение непрерывным радиосигналом) и нетепловое (облучение низкоинтенсивным импульсным радиосигналом).

Тепловое воздействие основано на поглощении энергии электромагнитного излучения полярными молекулами и преобразовании ее в тепло. Такое воздействие хорошо изучено, и его результаты представлены в большом количестве теоретических и прикладных работ [1, 2].

В последние годы начаты исследования нетеплового воздействия электромагнитного излучения на биологические структуры [3–9]. Они связаны с использованием результатов воздействия сугубо импульсного СВЧ-излучения на организмы, клетки, вирусы, молекулы, продукты питания и т.п. Такое облучение не приводит к повышению температуры исследуемого объекта, что в большинстве случаев является позитивным фактором. Предлагаемый метод импульсного электромагнитного облучения выгодно отличается от других методов обеззараживания простотой и отсутствием долговременных побочных эффектов, сохраняет структуру и свойства облучаемого материала. Поэтому следует признать актуальным дальнейшее более детальное и глубокое изучение и исследование эффектов и механизмов воздействия импульсного электромагнитного излучения на различные биологические структуры.

Материалы и методы

Для экспериментального изучения процессов воздействия импульсного СВЧ-радиоизлучения на биологические объекты разработана, изготовлена и испытана специальная радиоэлектронная аппаратура, которая обеспечивает необходимый набор элек-

трофизических параметров облучающего импульсного СВЧ-сигнала:

- диапазон частот воздействующего излучения;
- длительность радиосигнала;
- мощность;
- вид поляризации;
- время воздействия;
- скважность импульсов.

Уникальность аппаратуры обусловлена возможностью управлять основными электрофизическими параметрами облучающего радиосигнала для поиска оптимального режима облучения. Возможность эксплуатации такой аппаратуры вооружает исследователя ценной научной информацией, которая служит основой для понимания физического, биологического, информационного и химического механизмов взаимодействия импульсного СВЧ-излучения с клетками, молекулами и вирусами.

Источником радиосигналов в установке служат импульсные магнетроны с пиковой мощностью 1...10 кВт. Блок-схема и фотография установки показаны на рис. 1 и 2.

На магнетрон 7 подается напряжение накала и импульсное высоковольтное анодное напряжение. Импульсный высокочастотный сигнал с выхода магнетрона подается на Y-циркулятор 8, который служит для защиты магнетрона от отраженного сигнала. Далее СВЧ-мощность поступает в аттенуатор 9,

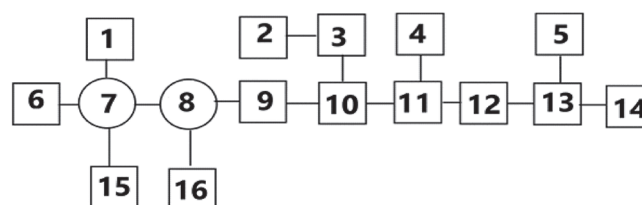


Рис. 1. Блок-схема экспериментальной установки:

1 – система охлаждения; 2 – осциллограф; 3 – детекторная секция; 4, 5 – измерители мощности; 6 – модулятор; 7 – магнетрон; 8 – Y-циркулятор; 9 – аттенуатор; 10, 11, 13 – направленные ответвители; 12 – рабочая камера; 14, 16 – согласованные нагрузки; 15 – блок накала

Fig. 1. Flow-chart of experimental setup:

1 – cooling system; 2 – oscilloscope; 3 – detection unit; 4, 5 – power meters; 6 – modulator; 7 – magnetron; 8 – Y-circulator; 9 – attenuator; 10, 11, 13 – directional couplers; 12 – working chamber; 14, 16 – matched loads; 15 – radiance unit



Рис. 2. Внешний вид одной из модификаций экспериментальной установки

Fig. 2. General view of one of modifications of the experimental setup

регулируя вносимое ослабление которого, можно изменять мощность, поступающую в рабочую камеру. Индикация импульсов СВЧ-мощности производится на осциллографе 2, измерение мощности, падающей на испытуемый объект, производится измерителем мощности 4, а измерение мощности, прошедшей через испытуемый объект, – измерителем мощности 5. Прошедшая мощность поглощается согласованной нагрузкой.

Испытуемые материалы облучались на экспериментальной установке импульсным СВЧ-излучением на частоте $(2,45 \pm 0,05)$ ГГц. Максимальная импульсная мощность составляла 0,1...10,0 кВт. Модулятор позволяет варьировать длительность импульсов в пределах 0,1...1,5 мкс; скважность лежит в пределах 500...10000; частота следования импульсов – 0,1...5,0 ГГц. Атенуатор позволяет плавно регулировать мощность, подаваемую в рабочую камеру. Разность падающей и прошедшей мощности представляет собой мощность, поглощенную облучаемым объектом.

Результаты и обсуждение

Комплекс проведенных экспериментальных исследований с использованием созданной аппаратуры на конкретных облучаемых образцах включал в себя ряд испытаний.

Исследовано воздействие импульсным СВЧ-излучением на образцы сырого мяса с целью увеличения показателей его микробиологической безопасности и сроков хранения. Указанные экспериментальные исследования проведены совместно со специалистами Тамбовского мясокомбината ООО «Тамбовский бекон», входящего в состав группы компаний «РУСАГРО». Определено оптимальное время облучения в результате его варьирования от десятков секунд до 16 минут.

По результатам испытаний контрольных и опытных групп образцов по показателям микробиологической безопасности после хранения в течение 28 суток получены следующие результаты: бактерии группы кишечной палочки не обнаружены; сальмонеллы не обнаружены; *Listeria monocytogenes* не об-

наружены; мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАнМ) – зафиксировано значительное сокращение популяции колониеобразующих единиц жизнеспособных микроорганизмов. На рис. 3 представлена диаграмма зависимости количества колониеобразующих единиц КМАФАнМ в 12 опытных образцах от длительности импульсного СВЧ-воздействия, равной 4, 8, 12 и 16 минутам, а также показано количество данных микроорганизмов в контрольной группе. Несмотря на вариативность полученных результатов в рамках каждой из временных групп, даже в случае наихудшего из них (№ 7) число патогенных микроорганизмов в образце оказалось не менее чем в 8 раз меньше аналогичного показателя для контрольной группы, а среднее арифметическое значение количества колониеобразующих единиц КМАФАнМ опытной группы – не менее чем в 27,5 раза меньше, чем в контрольной.

Для производителей мясной продукции увеличение сроков ее годности при сохранении высоких органолептических свойств продукта является одним из важнейших коммерческих показателей. Это объясняется тем, что в нашей стране потребители

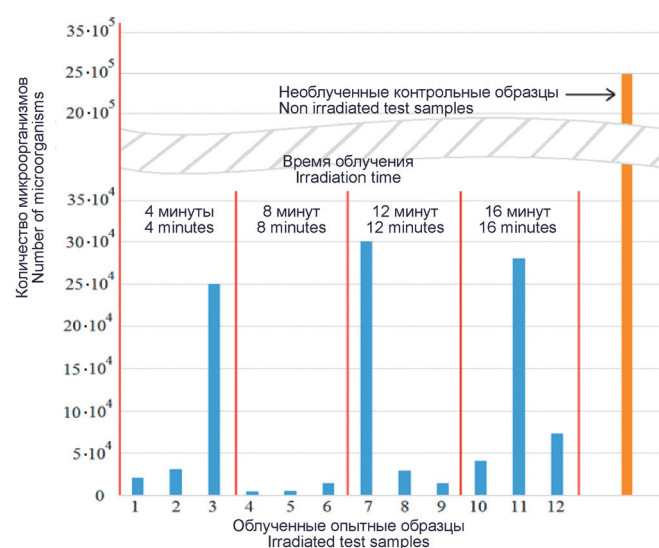


Рис. 3. КМАФАнМ опытной и контрольной групп

Fig. 3. Mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms of the experimental and control groups

мясной продукции зачастую могут находиться на расстоянии тысяч километров от места производства, что требует длительных сроков перевозок данной продукции с сохранением ее качества и гарантированной безопасности для потребителей.

Совместно с технологами Саратовского мясокомбината (ИП Фишер М.В.) проведена работа, связанная со значительным увеличением сроков хранения мяса и мясной продукции, а также с увеличением сроков хранения (при сохранении высоких органолептических свойств) готовых блюд из овощей, фруктов и зелени для предприятий общественного питания: кафе, ресторанов и столовых школ, вузов, техникумов, предприятий.

Результаты проведенных конкретных испытаний широкого диапазона контрольных и опытных групп образцов показали положительную динамику по срокам хранения растительных продуктов и вкусовым свойствам приготовленных из них блюд.

Совместно с учеными Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского проведены предварительные исследования медицинской направленности по определению режимов облучающего импульсного СВЧ-радиосигнала, максимально подавляющего онкологические новообразования в организме человека. Кроме того, проведены исследования по определению влияния импульсного электромагнитного излучения на характер автоколебательных химических процессов (реакция Бриггса – Раушера). Показана возможность изменения периода реакции, остановки и перезапуска так называемого химического сердца.

Введение в строй установки по импульсному облучению биологических материалов совпало по времени с возникновением и распространением в мире нового вида опасной коронавирусной инфекции COVID-19. Острая ситуация с пандемией коронавируса уже нашла отражение в научных публикациях. Изложенные выше результаты эксплуатации созданной экспериментальной установки позволяют сформулировать не только необходимые выводы и перспективы дальнейшей работы по решению упомянутых в статье задач, но и обозначить их развитие в направлении решения новых возникших проблем, провести анализ выявленных предположений, версий и гипотез. Они требуют дальнейшего глубокого изучения механизмов взаимодействия импульсного электромагнитного излучения СВЧ-диапазона и различных биологических объектов: живых организмов, продуктов питания, клеток, вирусов, бактерий и т.п. Для этого в ближайшее время актуальным и перспективным следует признать проведение экспериментальных исследований по следующим научным направлениям:

- оценить воздействие импульсного СВЧ-излучения на различные виды вирусов, которое с высокой степенью вероятности может привести к их уничтожению, лишению способности размножать-

ся, проникать в клетки человеческого организма и возбуждать образование новых разновидностей вирусов;

- провести глубокий анализ эффекта воздействия импульсного СВЧ-излучения на скорость химических реакций (скорость диффузии);

- исследовать зависимость результатов облучения биологических объектов и показателей их эффективности от типа поляризации облучающего импульсного СВЧ-сигнала;

- экспериментальным путем провести подробное исследование гипотезы, описывающей механизм воздействия импульсного СВЧ-излучения на биологическую клетку, предположительно основанный на следующих эффектах:

- корреляции частоты следования радиоимпульсов с частотой колебательных процессов внутри клетки;

- взаимодействия последовательности радиоимпульсов с низкой частотой следования (1...100 кГц) с заряженными элементами структуры клетки, которые также совершают колебания низкой частоты (колебания ее поверхности, мембраны, движение ионов).

Для дальнейшего изучения механизмов взаимодействия импульсного электромагнитного излучения СВЧ-диапазона и различных биологических объектов требуются серьезная модернизация и совершенствование разработанной экспериментальной установки в следующих направлениях:

- создать новую универсальную систему управления, контроля и индикации электрофизических параметров воздействующего импульсного электромагнитного сигнала СВЧ-диапазона с целью оптимизации режимов облучения;

- обеспечить возможность изменения типа поляризации облучающего сигнала;

- обеспечить регистрацию процесса облучения объекта с использованием современных средств микроскопии, фото- и видеотехники;

- наметить конкретные пути дополнительной модернизации экспериментальной установки для дальнейшего исследования влияния изменения параметров импульсного электромагнитного излучения на кооперативный эффект деления клеток.

В заключение нужно отметить, что для получения более глубоких фундаментальных результатов решения поставленной междисциплинарной проблемы, безусловно, необходимо тесное взаимодействие физиков, радиоэлектроников с учеными и специалистами, работающими в области биологии, биомедицины, химии и других смежных областей. Такое совместное сотрудничество ускорит устранение белых пятен в процессе познания в этой предметной области и позволит добиться высоких научных результатов.

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

Список литературы

1. Welt B., Tong C., Rossen J., Lund D. Effect of microwave radiation on inactivation of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60:482–8. DOI: 10.1128/aem.60.2.482-488.1994.
2. Letellier M., Budzinski H. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis.* 1997; 27(3):259–70. DOI: 10.1051/analisis:1999116.
3. Shaw P., Kumar N., Mumtaz S., Lim J.S., Jang J.H., Kim D., Sahu B.D., Bogaerts A., Choi E.H. Evaluation of non-thermal effect of microwave radiation and its mode of action in bacterial cell inactivation. *Sci. Rep.* 2021; 11(1):14003. DOI: 10.1038/s41598-021-93274-w.
4. Гуляев Ю.В., Черепенин В.А. О возможности использования мощных электромагнитных импульсов для обеззараживания бактериологически загрязненных объектов. *Журнал радиоэлектроники.* 2020; 4:11. DOI: 10/30898.1684-1719.2020.4.13.
5. Gulyaev Y.V., Taranov I.V., Cherepenin V.A. The use of high-power electromagnetic pulses on bacteria and viruses. *Doklady Physics.* 2020; 65(7):230–2. DOI: 10.1134/S1028335820070034.
6. Гуляев Ю.В., Таранов И.В., Черепенин В.А. Использование мощных электромагнитных импульсов для воздействия на бактерии и вирусы. *Доклады Российской академии наук. Физика, технические науки.* 2020; 493(1):15–7. DOI: 10.31857/S2686740020040069.
7. Kubo M.T., Siguemoto E.S., Funcia E.S., Augusto P.E.D., Curet S., Boillereaux L., Sastry S.K., Gut J.A.W. Non-thermal effects of microwave and ohmic processing on microbial and enzyme inactivation: a critical review. *Curr. Opin. Food Sci.* 2020; 35:36–48. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.01.004.
8. Lystsov V.N., Frank-Kamenetskii D.A., Shchedrina M.V. Effect of centimeter radiowaves on vegetative cells, spores and transforming DNA. *Biophysics.* 1965; 10(1):114–9.
9. Kaczmarczyk L.S., Marsay K.S., Shevchenko S., Pilosoff M., Levi N., Einat M., Oren M., Gerlitz G. Corona and polio viruses are sensitive to short pulses of W-band gyrotron radiation. *Environ. Chem. Lett.* 2021; 19(6):3967–72. DOI: 10.1007/s10311-021-01300-0.
5. Gulyaev Y.V., Taranov I.V., Cherepenin V.A. The use of high-power electromagnetic pulses on bacteria and viruses. *Doklady Physics.* 2020; 65(7):230–2. DOI: 10.1134/S1028335820070034.
6. Gulyaev Yu.V., Taranov I.V., Cherepenin V.A. [Using high-power electromagnetic pulses to impact bacteria and viruses]. *Doklady Rossiiskoi Akademii Nauk. Fizika, Tekhnicheskie Nauki [Reports of the Russian Academy of Sciences. Physics, Technical Sciences].* 2020; 493(1):15–7. DOI: 10/31857/S2686740020040069.
7. Kubo M.T., Siguemoto E.S., Funcia E.S., Augusto P.E.D., Curet S., Boillereaux L., Sastry S.K., Gut J.A.W. Non-thermal effects of microwave and ohmic processing on microbial and enzyme inactivation: a critical review. *Curr. Opin. Food Sci.* 2020; 35:36–48. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.01.004.
8. Lystsov V.N., Frank-Kamenetskii D.A., Shchedrina M.V. Effect of centimeter radiowaves on vegetative cells, spores and transforming DNA. *Biophysics.* 1965; 10(1):114–9.
9. Kaczmarczyk L.S., Marsay K.S., Shevchenko S., Pilosoff M., Levi N., Einat M., Oren M., Gerlitz G. Corona and polio viruses are sensitive to short pulses of W-band gyrotron radiation. *Environ. Chem. Lett.* 2021; 19(6):3967–72. DOI: 10.1007/s10311-021-01300-0.

References

1. Welt B., Tong C., Rossen J., Lund D. Effect of microwave radiation on inactivation of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60:482–8. DOI: 10.1128/aem.60.2.482-488.1994.
2. Letellier M., Budzinski H. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis.* 1997; 27(3):259–70. DOI: 10.1051/analisis:1999116.
3. Shaw P., Kumar N., Mumtaz S., Lim J.S., Jang J.H., Kim D., Sahu B.D., Bogaerts A., Choi E.H. Evaluation of non-thermal effect of microwave radiation and its mode of action in bacterial cell inactivation. *Sci. Rep.* 2021; 11(1):14003. DOI: 10.1038/s41598-021-93274-w.
4. Gulyaev Yu.V., Cherepenin V.A. [Concerning the possibility of using high power electromagnetic pulses for disinfection of bacteriologically contaminated objects]. *Zhurnal Radioelektroniki [Journal of Radio Electronics].* 2020; (4):11. DOI: 10/30898.1684-1719.2020.4.13.

Authors:

Gulyaev Yu.V. Institute of Radio Engineering and Electronics named after V.A. Kotelnikov. Building VII, 11, Mokhovaya St., Moscow, 125009, Russian Federation.

Meshchanov V.P., Kats B.M., Koplevatsky N.A., Lopatin A.A., Sayapin K.A., Elkin V.A. Research and Production Enterprise "NIKA-SVCh", Ltd. 66, Moskovskaya St., Saratov, 410012, Russian Federation. E-mail: nika373@bk.ru.

Komarov V.V., Bayburin V.B. Research and Production Enterprise "NIKA-SVCh", Ltd; 66, Moskovskaya St., Saratov, 410012, Russian Federation; e-mail: nika373@bk.ru. Saratov State Technical University named after Gagarin Yu.A.; 77, Politehnicheskaya St., Saratov, 410054, Russian Federation.

Rytik A.P. Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevsky. 83, Astrakhanskaya St., Saratov, 410012, Russian Federation.

Об авторах:

Гуляев Ю.В. Институт радиотехники и электроники имени В.А. Котельникова. Российская Федерация, 125009, Москва, ул. Моховая, 11, корп. 7.

Мещанов В.П., Кац Б.М., Коплевацкий Н.А., Лопатин А.А., Саяпин К.А., Елкин В.А. Научно-производственное предприятие «НИКА-СВЧ». Российская Федерация, 410012, Саратов, ул. Московская, 66. E-mail: nika373@bk.ru.

Комаров В.В., Байбури В.Б. Научно-производственное предприятие «НИКА-СВЧ»; Российская Федерация, 410012, Саратов, ул. Московская, 66; e-mail: nika373@bk.ru. Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.; Российская Федерация, 410054, Саратов, ул. Политехническая, 77.

Рытик А.П. Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского. Российская Федерация, Саратов, 410012, ул. Астраханская, 83.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-75-81

УДК 616.98:579.841.95(470.61)

М.В. Забашта¹, Н.Л. Пичурина¹, А.П. Хаметова¹, А.В. Забашта¹, И.В. Орехов¹, О.П. Добровольский¹,
В.В. Стахеев², Е.С. Фомина², Е.В. Ковалев³, А.В. Федченко³, А.К. Носков¹

Эпизоотия туляремии в популяции обыкновенной полевки в природном очаге степного типа на юго-востоке Ростовской области в 2020 году

¹ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация;
²ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук», Ростов-на-Дону, Российская Федерация; ³Управление Роспотребнадзора по Ростовской области, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Цель исследования – проведение эпизоотологического мониторинга природных очагов туляремии степного типа и изучение эпизоотической активности на юго-востоке Ростовской области. **Материалы и методы.** Эпизоотологическое обследование проведено в 2019–2021 гг. на территории Ремонтненского, Сальского и Песчанокского районов Ростовской области. При отлове, сборе млекопитающих, иксодовых клещей и исследовании проб полевого материала использованы традиционные методы. **Результаты и обсуждение.** Выявлено обитание 16 видов мелких млекопитающих, 6 видов иксодовых клещей. В результате молекулярно-генетического анализа полевок установлено обитание на исследуемой территории области вида *Microtus arvalis obscurus*. Зафиксирована циркуляция возбудителя туляремии в популяциях обыкновенной и общественных полевок, лесной мыши, зайца-русака, грача, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma marginatum*, снятых с грачей. В мае 2020 г. отмечен высокий рост численности общественной полевки в Ремонтненском районе (до 21 %), в июле 2020 г. – обыкновенной полевки (до 33 %) в агроценозах Сальского района. Выявлена разлитая эпизоотия туляремии в популяции обыкновенной полевки на территории юго-востока Ростовской области и на сопредельных территориях в Республике Калмыкия и Ставропольском крае. Из павших особей и отловленных зверьков общественной полевки выделено две культуры возбудителя туляремии, обыкновенной полевки – четыре. Выделенные штаммы относятся к голарктическому подвиду *Francisella tularensis* EryR. Полученные результаты свидетельствуют об активизации природного очага туляремии на юго-востоке Ростовской области и его высокой эпизоотической активности.

Ключевые слова: туляремия, природный очаг, эпизоотия, обыкновенная полевка, выделенные штаммы, иксодовые клещи.

Корреспондирующий автор: Забашта Марина Викторовна, e-mail: zabashta79@mail.ru.

Для цитирования: Забашта М.В., Пичурина Н.Л., Хаметова А.П., Забашта А.В., Орехов И.В., Добровольский О.П., Стахеев В.В., Фомина Е.С., Ковалев Е.В., Федченко А.В., Носков А.К. Эпизоотия туляремии в популяции обыкновенной полевки в природном очаге степного типа на юго-востоке Ростовской области в 2020 году. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:75–81. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-75-81

Поступила 25.01.2021. Отправлена на доработку 11.03.2021. Принята к публ. 20.07.2022.

M.V. Zabashta¹, N.L. Pichurina¹, A.P. Khametova¹, A.V. Zabashta¹, I.V. Orekhov¹, O.P. Dobrovol'sky¹,
V.V. Stakheev², E.S. Fomina², E.V. Kovalev³, A.V. Fedchenko³, A.K. Noskov¹

Epizooty of Tularemia, Detected in the Population of the Common Vole in the Natural Focus of Steppe Type in the South-East of the Rostov Region in 2020

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

²Federal Research Center "Southern Scientific Center" of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russian Federation;

³Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The aim of study was to conduct epizootiological monitoring of natural tularemia foci of the steppe type and investigate epizootic activity in the south-east of the Rostov Region. **Materials and methods.** An epizootiological survey was carried out on the territory of Remontnensky, Sal'sky and Peschanokopsky districts of the Rostov Region in 2019–2021. To capture and collect mammals, Ixodidae ticks and to study the samples of field material conventional methods were used. **Results and discussion.** Habitation of 16 species of small mammals, 6 species of Ixodidae ticks has been found. Molecular-genetic analysis of the voles has revealed the presence of the species *Microtus arvalis obscurus* in the studied area of the region. The circulation of the tularemia agent has been established in the population of common and social voles, forest mouse, hare, rook, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma marginatum*, removed from rooks. In May 2020, a high increase in the number of the social vole in the Remontnensky district (up to 21 %), in July 2020 – the common vole in the agroecosystems of the Sal'sky district (up to 33 %) was observed. An extensive epizooty of tularemia was detected in the population of common vole in the south-east of the Rostov Region and in adjacent territories in the Republic of Kalmykia and the Stavropol territory. Two cultures of the pathogen were isolated from the fallen and captured social voles, and four cultures – from the common vole. The isolated strains belong to the Holarctic subspecies of *Francisella tularensis* EryR. The results obtained attest to the activation of the natural tularemia focus in the south-east of the Rostov Region and its high epizootic activity.

Key words: tularemia, natural focus, epizooty, common vole, isolated strains, Ixodidae ticks.

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

Corresponding author: Marina V. Zabashta, e-mail: zabashta79@mail.ru.

Citation: Zabashta M.V., Pichurina N.L., Khametova A.P., Zabashta A.V., Orekhov I.V., Dobrovol'sky O.P., Stakheev V.V., Fomina E.S., Kovalev E.V., Fedchenko A.V., Noskov A.K. Epizooty of Tularemia, Detected in the Population of the Common Vole in the Natural Focus of Steppe Type in the South-East of the Rostov Region in 2020. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:75–81. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-75-81
Received 25.01.2021. Revised 11.03.2021. Accepted 20.07.2022.

Zabashta M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7404-4792>
Pichurina N.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1876-5397>
Khametova A.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4329-8340>
Zabashta A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4052-4741>
Orekhov I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7404-4792>

Dobrovol'sky O.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0306-8724>
Stakheev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5310-1732>
Fomina E.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7284-3766>
Kovalev E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0840-4638>
Noskov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Природные очаги туляремии степного и пойменно-болотного типа широко распространены на территории Ростовской области. В настоящее время энзоотичность установлена для 35 административных районов, в которых осуществляется активная эксплуатация территорий, включающих естественные ареалы циркуляции возбудителя туляремии.

За многолетний период изучения туляремии в Ростовской области в очагах степного типа установлены носители и источники выделения возбудителя, но к настоящему времени в биоценотической структуре туляремии произошли изменения, связанные, в первую очередь, с хозяйственной деятельностью человека. Так, начавшаяся в середине прошлого столетия повсеместная распашка целинных и залежных земель, уменьшение территорий естественных пастбищ привели к снижению численности предкавказского хомяка *Mesocricetus raddei* и, как следствие, основного переносчика возбудителя туляремии в популяции носителей *Ixodes laguri*. Основную роль в циркуляции возбудителя туляремии в очаге степного типа играют мышевидные грызуны (обыкновенная полевка *Microtus arvalis* s.l., лесная *Sylvaeus sylvaticus* s.l. и домовая *Mus musculus* мыши) [1].

В последние несколько десятилетий подъем численности основных носителей в очагах степного типа выявлен в 1989, 1992, 1996, 1997, 2000–2001 гг., после которых отмечены эпидемические осложнения с регистрацией спорадической и вспышечной заболеваемости туляремией. В декабре 1988 г. – январе 1989 г. от мышевидных грызунов, отловленных в Сальском районе и г. Сальске, выделено 37 культур *Francisella tularensis* и на фоне активизации эпизоотического процесса зарегистрировано 15 больных. Эпизоотологическая активность природного очага туляремии на юге Ростовской области отмечена в декабре 1996 г., когда на территориях Сальского, Целинского и Пролетарского районов выделены девять культур туляремийного микроба от домовой мыши, обыкновенной полевки и малой белозубки *Crocidura suaveolens*. На фоне эпизоотии в январе 1997 г. зарегистрирован больной туляремией в Пролетарском районе. Эта эпизоотия носила продолжительный характер, и в декабре 1997 г. из полевого материала, собранного в Сальском и Пролетарском районах, выделено 16 культур туляремийного микроба.

Необходимо отметить, что на сопредельных с областью территориях Республики Калмыкия на протяжении нескольких десятилетий также отмечалась активизация природных очагов туляремии. Так,

по данным Г.В. Лиджи-Гаряевой с соавт. [2], эпизоотии туляремии выявляли в период с 1978–1990 гг. в юго-западной части республики – в Городовиковском и Яшалтинском районах. В эпизоотии включались домовые и лесные мыши, обыкновенные полевки и серые хомячки. В дальнейшем эпизоотии туляремии среди мышевидных грызунов с выделением культур регистрировали в 1998, 2001, 2002 гг. на территории шести районов, в том числе и Городовиковского [2].

Современная эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка по этому зоонозу на юге Ростовской области оценивается как напряженная. После длительного перерыва случаи заболевания туляремией зарегистрированы в январе 2017 г. на территории очага степного типа в Целинском районе и *F. tularensis* изолирована из пробы от зайца-русака *Lepus europaeus* [3]. При этом ежегодно отмечается циркуляция возбудителя туляремии в популяциях носителей и переносчиков с выявлением его маркеров.

Цель исследования – проведение эпизоотологического мониторинга природных очагов туляремии степного типа и изучение эпизоотической активности на юго-востоке Ростовской области.

Материалы и методы

В 2019–2021 гг. эпизоотологическое обследование природных очагов вирусных и бактериальных инфекций проведено на территории Ремонтненского, Сальского и Песчанокского административных районов Ростовской области. Обследование Ремонтненского района проведено в окрестностях населенных пунктов Ремонтное, Первомайское, Краснопартизанский, Кормовое, Киевка; на территории Сальского района – в окрестностях г. Сальска, населенных пунктов Гигант, Клены, Новый Егорлык, Сандата, Крупский, Романовка; Песчанокского района – Песчанокское, Летник, Поливянка, Раздельный.

При сборе полевого материала использованы традиционные методы эпизоотологического обследования территории: методы ловушко-ночей и флаго-часов, маршрутный метод. Сбор иксодовых клещей проводили при эктопаразитологических осмотрах птиц и млекопитающих, а также на флаг. Видовой состав клещей определяли по диагностическим признакам, указанным в определителях [4, 5]. Дифференциацию полевок надвида *M. arvalis* s.l. проводили при помощи анализа первичной изменчивости фрагмента гена *цитохром b*. Лабораторные исследования полевого материала осуществляли

с помощью набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый жидкий «РНГА-Тул-Иг-Став НИПЧИ», «GenPak® DNA PCR test набор реагентов для амплификации ДНК *Francisella tularensis*, *holarctica*» (ООО «Лаборатория Изоген»), «ОМ-Скрин-Туляремия-РВ» (ЗАО «Синтол»). ДНК из биологических проб выделяли с помощью набора «Рибо-преп» («Амплисенс»).

Результаты и обсуждение

При обследовании природных и антропогенных биоценозов в исследуемых районах выявлено 16 видов мелких млекопитающих: малая лесная мышь *S. uralensis*, степная (желтобрюхая) мышь *S. witherbyi*, домовая мышь, обыкновенная полевка *M. arvalis*, восточноевропейская полевка *M. rossiaemeridionalis*, общественная полевка *M. socialis*, серый хомячок *Cricetulus migratorius*, кавказский крот *Talpa caucasica*, серая крыса *Rattus norvegicus*, мышь-малютка *Micromys minutus*, заяц-русак, малая белозубка, кавказская бурозубка *Sorex satunini*, белогрудый еж *Erinaceus roumanicus*, большой тушканчик *Allactaga major*, ласка *Mustela nivalis*.

Обыкновенная полевка на юге области обитает в засушливых биотопах, заселяя в основном агроценозы. Необходимо отметить, что вид *M. arvalis* s.l. состоит из нескольких самостоятельных, но сходных по морфологическим признакам и биологии видов. В Ростовской области и на приграничных территориях обитает два вида-двойника: обыкновенная полевка *M. arvalis* и восточноевропейская полевка *M. rossiaemeridionalis*. Поскольку они не имеют выраженных морфологических отличий, достоверное определение возможно только с применением специальных методов исследований (кариотипирование, электрофорез белков, молекулярно-генетический анализ). Все исследованные нами полевки относились к подвиду *M. arvalis obscurus*. Исключение составили две особи из окрестностей с. Матросово (Республика Калмыкия), эти зверьки относятся к восточноевропейской полевке. Упомянутый локалитет находится вблизи оросительного канала. По всей видимости, в агроценозах рассматриваемого района доминирует обыкновенная полевка, а распространение восточноевропейской полевки связано с более увлажненными околородными биотопами. Ранее экологическая сегрегация полевок надвида *M. arvalis* по отношению к влажности местообитаний показана Г.Н. Тихоновой с соавт. [6]. Поскольку видовая идентификация упомянутой группы проводилась нами только на отдельных участках, далее в тексте мы будем рассматривать их совокупно, на уровне надвида «обыкновенная полевка».

Погодные условия конца 2019 – начала 2020 г. были благоприятными, что выразилось в теплой осени и положительных температурах зимних месяцев. В южных районах области залегание снежного покрова было кратковременным, выпадение значитель-

ного количества атмосферных осадков в виде дождей способствовало ранней вегетации растений и формированию кормовых условий для мелких млекопитающих в ранневесенний период 2020 г. При анализе структуры земель сельскохозяйственного назначения, предназначенных для растениеводства, установлено, что большая часть территории Сальского и Песчанокского районов занята пашней, основные культуры посевов: озимая и яровая пшеница, подсолнечник, ячмень. В Ремонтненском районе около половины земель используется под посевы, а остальная часть занята пастбищами и участками целинных степей.

Обследование степных биотопов в Ремонтненском районе показало, что среди мелких млекопитающих доминирует общественная полевка. Ее средняя численность в мае 2020 г. составила 8,9 %, при максимальном проценте попадаемости 21 %, что свидетельствует о высокой численности. По сравнению с предыдущим периодом численность вида увеличилась в несколько раз: так, при отловах в 2018–2019 гг. численность полевок варьировала от 1,5 до 5,5 %. К концу июля 2020 г. численность общественной полевки не только сохранилась на прежнем уровне, но и достигла еще более высоких значений (до 50 % попадаемости).

При визуальном обследовании и поиске поселений общественных полевок на сохранившихся целинных участках степи в окрестностях с. Первомайское в мае 2020 г. обнаружены павшие особи общественной полевки, из проб которых при лабораторном исследовании изолирована культура туляремии. Также *F. tularensis* выделена из проб от особей данного вида, отловленных в окрестностях с. Ремонтного, что указывает на активизацию природного очага степного типа и, возможно, локальную эпизоотию туляремии. Ранее активность очага отмечалась в 1978 г. с выявлением антигена туляремиального микроба в погадках хищных птиц. Культуры туляремии от общественной полевки в данном очаге не изолированы.

В результате эпизоотологического мониторинга территории Сальского и Песчанокского районов установлено, что основным фоновым видом является обыкновенная полевка. При учете численности грызунов также в отловах присутствовали желтобрюхая, малая лесная и домовая мыши. Процент попадаемости лесных мышей колебался в пределах от 2,5 до 8,8 %, домовых мышей – от 1,3 до 5,7 %. Повышение численности лесных и домовых мышей по сравнению со среднесезонными показателями не установлено.

При анализе собственных данных выявлено, что численность обыкновенной полевки в сезон 2019 г. колебалась в пределах 2,7–7,2 %. В весенний период 2020 г. численность грызунов оставалась на прежнем уровне, ненамного превышая показатели предыдущего периода – 4,5–7,9 %. Необходимо отметить, что несмотря на отсутствие всплеска численности грызунов в мае, в окрестностях с. Новый Егорлык

(Сальский район) обнаружены первые единичные павшие особи зверьков – обыкновенной полевки и серого хомячка, что, возможно, указывает на начало эпизоотии туляремии среди грызунов в весенний период.

В июле в Ростовской области проводится уборка зерновых культур. При визуальном обследовании Сальского района 5 июля 2020 г. наблюдалась высокая численность обыкновенной полевки. Нами отмечены массовые миграции грызунов с сельскохозяйственных полей и концентрация их вдоль автодорог, прилегающих к агроценозам. Визуально зафиксировано большое число раздавленных автомашинами зверьков – до нескольких сотен на 1 км дороги. По-видимому, отмеченные массовые перемещения грызунов связаны с разрушением колониальных поселений и лишением привычных местообитаний в результате уборки урожая с последующей вспашкой сельскохозяйственных полей.

С целью выявления активизации эпизоотического процесса и возможной эпизоотии туляремии проведено эпизоотологическое обследование в местах регистрации высокой численности грызунов. За время проведения мониторинга 13–19 июля 2020 г. в открытых станциях в окрестностях населенных пунктов Сандата, Крупский, Новый Егорлык, Клёны, Романовка накоплено 550 ловушко-ночей. Территория обследования представлена большей частью агроценозами с полесозащитными лесными полосами, а также пастбищными участками, солончатыми естественными водоемами, степными реками (Большая Сандата, Егорлык, Большой Гок и др.) и локальными участками искусственных лесов. Для определения границ эпизоотии туляремии визуальное обследование сходных местообитаний на сопредельных с областью территориях: в Республике Калмыкия и Ставропольском крае.

На территории Сальского района отловлено 98 экз. обыкновенной полевки. Средний процент попадаемости грызунов составил 18,1 %, варьируя по точкам отлова в пределах 2,5–33,0 %. По сравнению с предыдущим периодом, в июне – июле 2019 г. при среднем проценте попадаемости 4,8 %, численность грызунов выросла в несколько раз, в основном за счет увеличения плотности населения обыкновенной полевки.

В период 3–7 августа 2020 г. проведено рекогносцировочное эпизоотологическое обследование на территории Песчанокоспского района. При учете мелких млекопитающих в открытых станциях средняя численность носителей составила 9,0 % попадаемости. При этом преобладала обыкновенная полевка – от 4 до 8 %, содоминантами которой являлись лесные мыши – 3,25 %. В сборах также присутствовала малая белозубка – 0,25 %. Согласно наблюдениям жителей Песчанокоспского района, в первой декаде июля 2020 г. также отмечены высокая численность обыкновенной полевки и ее массовая миграция с полей, где закончены сельскохозяйственные работы.

При целенаправленном поиске трупов грызунов в Сальском и Песчанокоспском районах, а также на приграничных территориях Республики Калмыкия и Ставропольского края на фоне увеличения численности обыкновенной полевки и начавшихся перекочек этих грызунов в июле обнаружено, что смертность зверьков заметно увеличилась по сравнению с весенним периодом. Трупы наблюдали повсеместно как на территории области, так и на сопредельных территориях, в том числе встречались агонизирующие особи. В Сальском и Песчанокоспском районах Ростовской области собраны 15 трупов грызунов, на территории Калмыкии (Яшалтинский, Городовиковский районы) и Ставропольского края (Ипатовский городской округ, Красногвардейский муниципальный округ) – 5 павших особей. Повторное визуальное обследование в августе тех же местообитаний в Ростовской области выявило снижение численности обыкновенной полевки. Павшие особи встречались реже, единично и локально. Вероятно, эпизоотия среди грызунов к этому времени пошла на спад. На приграничной с Ростовской областью территории эпизоотия еще продолжалась, но уже менее интенсивно. Встречались как недавно павшие зверьки, так и трупы различной сохранности, в том числе мумифицированные. В результате проведенных исследований в июле 2020 г. на территории Сальского района в окрестностях с. Новый Егорлык, х. Крупский, с. Романовка выделено четыре культуры туляремийного микроба от трупов обыкновенной полевки и от пойманных зверьков.

Обследование юго-восточных территорий области в 2021 г. показало, что численность общественной и обыкновенной полевки по сравнению с предыдущим периодом снизилась, показатели численности в весенне-летний период не превышали средних значений и колебались в пределах 3,5–4,6 %. Павшие зверьки не обнаружены. При лабораторном исследовании мелких млекопитающих и кровососущих членистоногих на наличие возбудителя туляремии выявлен положительный результат (методом ПЦР) в пробе обыкновенной полевки, отловленной в марте в Сальском районе. Полученные данные свидетельствуют о продолжающейся циркуляции возбудителя туляремии в популяции полевки и активности природного очага туляремии на юго-востоке области.

При обследовании юго-восточных районов в 2019–2021 гг. в открытых биотопах и при осмотре различных видов птиц и млекопитающих выявлено шесть видов иксодовых клещей.

Появление первых имаго иксодовых клещей рода *Dermacentor* отмечается в марте, характерно два периода активности: март – июнь и сентябрь – ноябрь. В Ремонтненском районе *D. marginatus* собран нами на флаг в единичных экземплярах. На территории Сальского района встречается регулярно, наибольшей численности достигает в марте – апреле – 9–18 экз. на фл/ч, постепенно снижая численность к маю. При наличии благоприятных

природно-климатических условий может появляться в сборах в сентябре с невысокими показателями численности – 2–5 экз. на фл/ч. Обитание другого вида – *D. reticulatus* – выявлено лишь в некоторых местообитаниях Сальского района. Анализ собственных и литературных данных показал, что ареал *D. reticulatus*, обитающего до этого лишь в лесной зоне, на юге европейской части России претерпел значительные изменения: произошло продвижение вида на юг, включая низовья Дона и Западное Предкавказье. При этом восточная граница ареала *D. reticulatus* проходит через Сальский район, захватывая только западную его часть. Восточнее, в остальной части Сальского, а также в Ремонтненском, Заветинском районах области и на прилегающих территориях Республики Калмыкии, обитание вида не установлено. При учете численности иксодовых клещей и сборах их на флаг *D. reticulatus* отмечены в весенний период в окрестностях х. Степной Курган и п. Клены Сальского района – 2–9 экз. на фл/ч.

Первые единичные экземпляры имаго *Rhipicephalus rossicus* появляются в конце апреля и встречаются до конца июля, в июне достигают наибольшей численности – 15–25 экз. на фл/ч, после чего отмечается спад численности. Так, в июле 2020 г. численность *R. rossicus* в искусственном лесном массиве в окрестностях п. Клены Сальского района составила 6–8 экз. на фл/ч. По сравнению с предыдущим периодом изменения в динамике численности не выявлены.

Hyalomma marginatum на флаг практически не отлавливается, в редких случаях обнаруживается при собственном осмотре. Активность имаго на крупном и мелком рогатом скоте – март – июнь, показатели численности в Ремонтненском, Сальском районах на прокормителях – от 5 до 22 экз. Встречаемость преимагинальных стадий на птицах (грач *Corvus frugilegus*, серая ворона *Corvus cornix*, сорока *Pica pica*, полевой жаворонок *Alauda arvensis*, степной жаворонок *Melanocorypha calandra*) – июль – сентябрь, показатели численности – от единичных до нескольких десятков экземпляров, иногда до 300 экз. Кроме того, на врановых птицах совместно с *H. marginatum* паразитируют личинки и нимфы *H. punctata* – 1–5, иногда до нескольких десятков экземпляров на одной особи.

Ixodes ricinus в степных районах распространен локально в лесных биотопах. Имеет два периода активности: март – июнь и сентябрь – октябрь. Численность в окрестностях п. Клены (Сальский район) в весенний период варьировала от 6 до 21 экз. на фл/ч. На территории открытых степных участков южных и юго-восточных районов клещи *I. ricinus* не обнаружены.

Изменения в динамике численности иксодовых клещей в период эпизоотологического мониторинга в 2019–2021 гг. не выявлены, показатели численности отмечены в пределах среднесезонных. При паразитологическом осмотре грызунов, отловлен-

ных давилками Геро в сезон 2019–2021 гг., иксодовых клещей обнаружить не удалось. Из других групп кровососущих членистоногих, паразитирующих на грызунах, отмечены гамазовые клещи *Gamasoidea* и единичные экземпляры блох. Возможно, что переносчиком, способным поддерживать циркуляцию возбудителя туляремии в популяции обыкновенной полевки, являются гамазовые клещи.

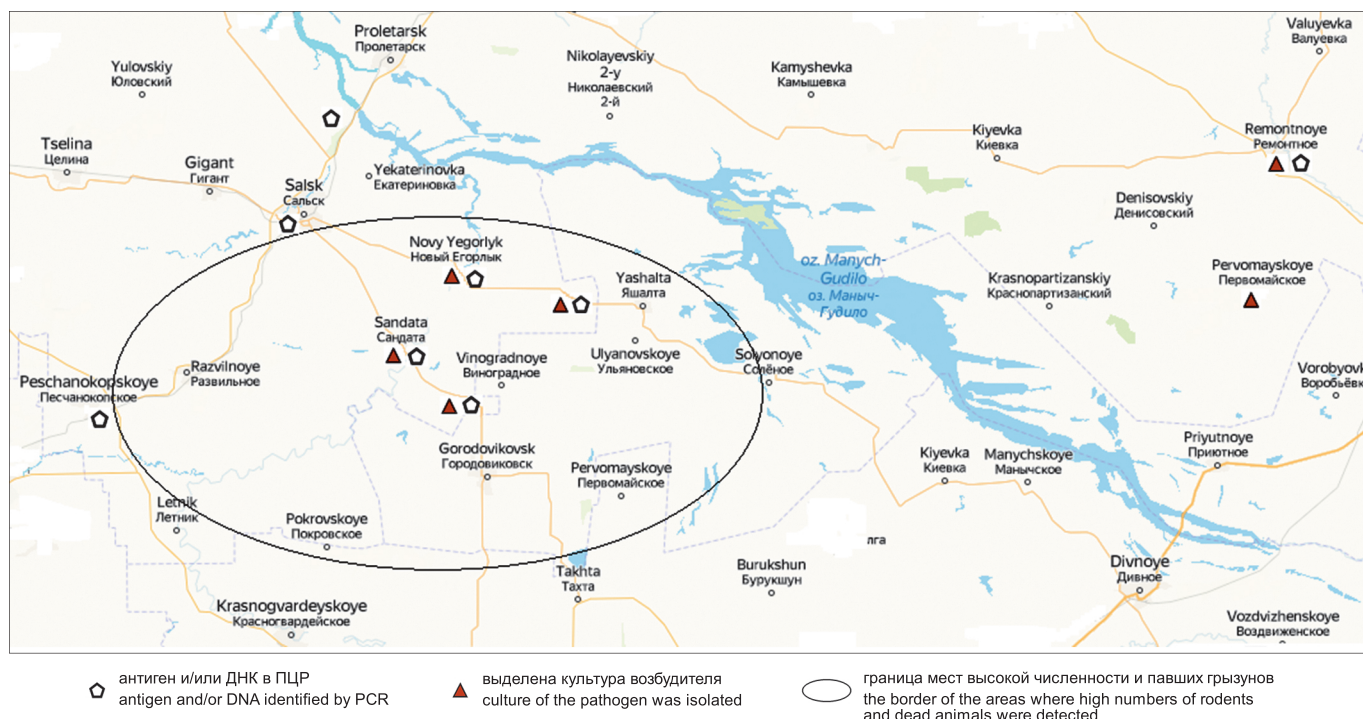
В результате лабораторных исследований собранного полевого материала, в том числе за предшествующий период, установлена циркуляция возбудителя туляремии в популяции носителей и переносчиков (рисунок). ДНК возбудителя в ПЦР обнаруживали в Сальском районе: в окрестностях п. Манычстрой в пробе от лесной мыши (июль 2017 г.), в балке Хлебной в трех пробах *D. marginatus* (апрель 2019 г.), в окрестностях г. Сальска в пробах *H. marginatum*, снятых с грачей (сентябрь 2019 г.); в Ремонтненском районе – в окрестностях с. Ремонтное в пробах *H. marginatum*, также собранных с грачей и зайца-русака (июль 2019 г.).

В 2020 г. в Сальском районе первые находки зафиксированы во второй декаде марта. Антиген туляремийного микроба выявлен в шести пробах лесных мышей и двух пробах обыкновенной полевки. Также в весенний период (март – апрель) антиген обнаружен в одной пробе домового мыши. В летний период (май – июль) число положительных находок и разнообразие выявленных маркеров значительно выше: четыре культуры *F. tularensis* от обыкновенных полевок, собранных павшими и отловленными живыми; находки антигена в 12 пробах; ДНК в ПЦР – в 5. Однако число компонентов паразитарной системы, вовлеченных в эпизоотический процесс, ограничивалось только обыкновенной полевкой. Исключение составила единственная положительная в ПЦР проба мозга грача, отловленного во вторую декаду июля.

В Песчанокопском районе при исследованиях, проведенных в июле 2020 г., изолировать культуру *F. tularensis* не удалось. Положительные находки (антиген и ДНК в ПЦР) выявлены в пробах от малой лесной мыши и обыкновенной полевки.

В результате проведенных исследований в 2020 г. на территории юго-востока Ростовской области получено шесть культур возбудителя туляремии. Установлено, что выделенные штаммы являются типичными представителями голарктического подвида *F. tularensis* EryR, характеризуются генетическим разнообразием и образуют четыре генотипа. При этом циркулирующие на территории Сальского района штаммы оказались генетически идентичны штамму, изолированному в степном очаге туляремии в 1989 г. Это, возможно, указывает на то, что идентичные (или близкородственные) клоны штаммов возбудителя туляремии могут стабильно сохраняться в течение длительного времени [7].

Необходимо отметить, что в результате обследования территории юго-востока области в 2021 г. установлено снижение численности общественной



Места выявления маркеров туляремии из проб полевого материала на территории юго-востока Ростовской области

Sites of tularemia markers detection from field material samples on the territory in the south-east of the Rostov Region

и обыкновенной полевки, показатели численности в весенне-летний период не превышали средних значений и колебались в пределах 3,5–4,6 %. Павшие зверьки не обнаружены, что указывает на отсутствие эпизоотии туляремии в популяциях указанных видов. При лабораторном исследовании мелких млекопитающих и кровососущих членистоногих на наличие возбудителя туляремии выявлен положительный результат в ПЦР в пробе обыкновенной полевки, отловленной в марте в Сальском районе. Полученные данные свидетельствуют о продолжающейся циркуляции возбудителя туляремии в популяции полевки и активности степного очага туляремии на юго-востоке Ростовской области.

Несмотря на высокую активность природного очага туляремии, больные туляремийной инфекцией в 2020–2021 гг. в Ростовской области не выявлены в связи со своевременным обнаружением эпизоотии среди грызунов и проведением комплекса профилактических (противоэпидемических) мер.

С целью совершенствования эпидемиологического надзора необходимо продолжить слежение за динамикой численности популяций носителей и переносчиков возбудителя туляремии в степных очагах, выявление эпизоотий среди животных, а также проведение комплексной оценки изменений структуры видового состава носителей туляремийного микроба. Также необходимо проводить плановую вакцинопрофилактику населения энзоотичных по туляремии территорий и дератизационные работы в открытых стациях в местах массовых поселений грызунов.

Таким образом, в результате проведенного эпизоотологического мониторинга на юго-восточных территориях Ростовской области (Ремонтненский, Сальский, Песчанокопский районы) определены видовой состав, численность, биотопическое распределение носителей и переносчиков возбудителя туляремии. Установлено, что в циркуляцию возбудителя туляремийного микроба включаются обыкновенная и общественная полевки, малая лесная и домовая мыши, заяц-русак, грач, а также иксодовые клещи *H. marginatum*, *D. marginatus*. В 2020 г. в весенне-летний период зарегистрирована вспышка численности общественной и обыкновенной полевки, отмечены миграции грызунов, обнаружены трупы павших полевки. Выявлена разлитая эпизоотия в популяциях обыкновенной полевки *M. arvalis obscurus* и общественной полевки *M. socialis* на территории Ростовской области в границах населенных пунктов Ремонтное, Первомайское (Ремонтненский район), Сандата, Крупский, Новый Егорлык, Романовка (Сальский район), Песчанокопское, Раздельный (Песчанокопский район), а также на сопредельных с ними территориях Республики Калмыкии и Ставропольского края. Эпизоотия подтверждена выделением шести культур возбудителя и находками антигена и ДНК туляремийного микроба, что свидетельствует о высокой эпизоотической активности природного очага степного типа. Следует отметить, что в настоящий период в природном очаге сформировались благоприятные условия для активизации эпизоотического процесса, что, в свою очередь, способствует увеличению угрозы заболевания насе-

ления, постоянно проживающего или временно находящегося в условиях риска заражения. Результаты эпизоотологического мониторинга, являющегося составляющей эпидемиологического надзора за туляремией, использованы для проведения профилактических мероприятий для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

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

Список литературы

1. Арутюнов Ю.И., Мишанькин Б.Н., Пичурина Н.Л., Водопьянов А.С. Некоторые особенности проявления туляремии в Южном федеральном округе: Ростовская область (история вопроса). *Научная мысль Кавказа*. 2007; 2:43–51.
2. Лиджи-Гаряева Г.В., Попов В.П., Яшкуллов К.Б., Оброткина Н.Ф., Санджиев Д.Н. О природных очагах туляремии в Республике Калмыкия. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2019; 1:79–82.
3. Ковалев Е.В., Карпущенко Г.В., Швагер М.М., Полонский А.В., Сидельников В.В., Гончаров А.Ю., Половинка Н.В. Особенности распространения туляремийной инфекции в Ростовской области. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 6:37–40. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-6-37-40.
4. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства *Amblyomminae*. Фауна России и сопредельных стран. Паукообразные. Т. IV, вып. 5. СПб.; 1997. 436 с.
5. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства *Ixodinae*. Фауна СССР. Паукообразные. Т. IV, вып. 4. Л.; 1977. 481 с.
6. Тихонова Г.Н., Тихонов И.А., Богомолов П.Л., Полякова Л.В. К вопросу об экологии видов-двойников *Microtus arvalis* Pallas 1779 и *Microtus rossiaemeridionalis* Ognev 1924 (Rodentia, Cricetidae) в Цимлянских песках. *Известия РАН*. 1999; 3:309–18.
7. Цимбалистова М.В., Сорокин В.М., Аронова Н.В., Анисимова А.С., Пичурина Н.Л., Пасюкова Н.И., Селянская Н.А., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Павлович Н.В., Ковалев Е.В., Носков А.К. Биологические свойства и генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, изолированных на территории Ростовской области в 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 3:134–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-134-140.

References

1. Arutyunov Yu.I., Mishan'kin B.N., Pichurina N.L., Vodop'yanov A.S. [Some features of tularemia manifestation in the Southern Federal District: Rostov Region (history of the issue)]. *Nauchnaya Mysl' Kavkaza [Scientific Thought of the Caucasus]*. 2007; (2):43–51.

2. Lidzhi-Garyeva G.V., Popov V.P., Yashkulov K.B., Obrotkina N.F., Sandzhiev D.N. [On natural foci of tularemia in the Republic of Kalmykia]. *Karantinnye i Zoonoznye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. 2019; (1):79–83.
3. Kovalev E.V., Karpushchenko G.V., Shvager M.M., Polonsky A.V., Sidel'nikov V.V., Goncharov A.Yu., Polovinka N.V. [Features of distribution of the tularemia infection in the Rostov Region]. *Epidemiologiya i Vaksinooprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2017; 16(6):37–40. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-6-37-40.
4. Filippova N.A. [Ixodic Mites of the Subfamily *Amblyomminae*. Fauna of Russia and Neighboring Countries]. *Arachnids*. Vol. IV, Issue 5. St. Petersburg; 1997. 436 p.
5. Filippova N.A. [Ixodic Mites of the Subfamily *Ixodinae*. Fauna of the USSR]. *Arachnids*. Vol. IV, Issue 4. Leningrad; 1977. 481 p.
6. Tikhonova G.N., Tikhonov I.A., Bogomolov P.L., Polyakova L.V. [On the ecology of the twin species *Microtus arvalis* Pallas 1779 and *Microtus rossiaemeridionalis* Ognev 1924 (Rodentia, Cricetidae) in the Tsimlyansk sands]. *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk [RAS Bulletin]*. 1999; (3):309–318.
7. Tsimbalistova M.V., Sorokin V.M., Aronova N.V., Anisimova A.S., Pichurina N.L., Pasyukova N.I., Selyanskaya N.A., Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Pavlovich N.V., Kovalev E.V., Noskov A.K. Biological properties and genetic characteristics of *Francisella tularensis* strains isolated in the territory of the Rostov Region in 2020. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (3):134–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-134-140.

Authors:

Zabashta M.V., Pichurina N.L., Khametova A.P., Zabashta A.V., Orekhov I.V., Dobrovolsky O.P., Noskov A.K. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.
 Stakheev V.V., Fomina E.S. Federal Research Center "Southern Scientific Center" of the Russian Academy of Sciences. 41, Chekhov Avenue, Rostov-on-Don, 344010, Russian Federation. E-mail: stakheev@ssc-ras.ru.
 Kovalev E.V., Fedchenko A.V. Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region. 17, 18th Line St., Rostov-on-Don, 344019, Russian Federation. E-mail: master@rpdn.ru.

Об авторах:

Забашта М.В., Пичурина Н.Л., Хаметова А.П., Забашта А.В., Орехов И.В., Добровольский О.П., Носков А.К. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.
 Стахеев В.В., Фомина Е.С. Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук. Российская Федерация, 344010, Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41. E-mail: stakheev@ssc-ras.ru.
 Ковалев Е.В., Федченко А.В. Управление Роспотребнадзора по Ростовской области. Российская Федерация, 344019, Ростов-на-Дону, ул. 18-я Линия, 17. E-mail: master@rpdn.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-82-89

УДК 616.6:579.842.11(470.44)

А.В. Казанцев¹, М.В. Проскурякова¹, Е.С. Казакова¹, Н.А. Осина¹, И.Г. Швиденко², А.Н. Микеров^{2,3}**Антибиотикорезистентность уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с инфекциями мочевыводящих путей в урологическом стационаре клинической больницы Саратова**¹ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;²ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Саратов, Российская Федерация; ³Саратовский медицинский научный центр гигиены ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Саратов, Российская Федерация

Цель работы – изучить профиль антибиотикорезистентности уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с инфекциями мочевыводящих путей в урологическом стационаре клинической больницы Саратова, в зависимости от принадлежности к филогенетическим группам и подгруппам, О-серогруппам. **Материалы и методы.** У 102 штаммов уропатогенных *E. coli* (УПЭК), выделенных из мочи пациентов с инфекциями мочевыводящих путей, изучена чувствительность/устойчивость к 25 различным антибактериальным препаратам. Исследования проводили с использованием диско-диффузионного метода. Методом двойных дисков оценена продукция бета-лактамаз расширенного спектра. Продукцию карбапенемаз определяли с использованием СИМ-теста. Методом ПЦР определяли принадлежность к филогенетическим группам и подгруппам, О-серогруппам, а также частоту встречаемости генов *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, кодирующих белки, опосредующих развитие резистентности к колистину. **Результаты и обсуждение.** Установлено, что все штаммы уропатогенных *E. coli* в той или иной мере обладают резистентностью к антибактериальным препаратам. У всех изученных 102 штаммов выявлена резистентность к 23 антибактериальным препаратам из 8 функциональных групп. Резистентность штаммов уропатогенных *E. coli* в зависимости от принадлежности к филогенетическим группам и подгруппам, О-серогруппам имела определенные отличия. Штаммы уропатогенных *E. coli*, обладающие высокой резистентностью (до 100,0 %), принадлежали к филогенетической подгруппе B2₃, основными представителями которой являются культуры наиболее часто встречающейся O25-серогруппы. Фенотипически подтверждена продукция бета-лактамаз расширенного спектра для 69 (67,6 %) штаммов. Карбапенемазопroduцирующие культуры в исследовании не выявлены. У 3 штаммов (2,9 %) УПЭК выявлены гены *mcr-1* и *mcr-2*, кодирующие резистентность к колистину.

Ключевые слова: уропатогенные *Escherichia coli*, инфекции мочевыводящих путей, антибиотикорезистентность, О-серогруппы, филогенетическая характеристика, бета-лактамазы расширенного действия.

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

Для цитирования: Казанцев А.В., Проскурякова М.В., Казакова Е.С., Осина Н.А., Швиденко И.Г., Микеров А.Н. Антибиотикорезистентность уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с инфекциями мочевыводящих путей в урологическом стационаре клинической больницы Саратова. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 3:82–89. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-82-89

Поступила 16.09.2022. Принята к публ. 20.09.2022.

A.V. Kazantsev¹, M.V. Proskuryakova¹, E.S. Kazakova¹, N.A. Osina¹, I.G. Shvidenko², A.N. Mikerov^{2,3}**Antibiotic Resistance of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections at the Urological Inpatient Facility of the Saratov Clinical Hospital**¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;²Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, Russian Federation;³Saratov Medical Scientific Center of Hygiene, Federal Scientific Center of Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Saratov, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to study the profile of antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in the urological inpatient facility of the clinical hospital in the Saratov city, depending on appurtenance to phylogenetic groups and subgroups, as well as O-serogroups. **Materials and methods.** We assessed sensitivity/resistance to 25 different antibacterial drugs in 102 strains of uropathogenic *E. coli*. The studies were carried out using the disk diffusion method. The production of extended spectrum beta-lactamases was evaluated by the double disk method. Carbapenemase output was determined using the CIM test. The PCR method was applied to determine appurtenance to phylogenetic groups and subgroups, O-serogroups, as well as the frequency of occurrence of the *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* genes encoding the proteins that mediate the development of resistance to colistin. **Results and discussion.** It has been established that all strains of uropathogenic *E. coli* are more or less resistant to antibacterial drugs. All studied 102 strains showed resistance to 23 antibacterial drugs from 8 functional groups. The resistance of uropathogenic *E. coli* had certain differences depending on belonging to phylogenetic groups and subgroups, O-serogroups. Strains of uropathogenic *E. coli* with high resistance (up to 100 %) belonged to the B2₃ phylogenetic group, the main representatives of which are cultures of the most common O-25 serogroup. The production of extended-spectrum beta-lactamases has been phenotypically confirmed for 69 (67.6 %) strains. No carbapenemase-producing cultures were found in the study. The *mcr-1* and *mcr-2* genes encoding resistance to colistin have been identified in 3 uropathogenic *E. coli* strains (2.9 %).

Key words: uropathogenic *Escherichia coli*, urinary tract infections, antibiotic resistance, O-serogroups, phylogenetic characteristics, extended-spectrum beta-lactamases

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

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

Citation: Kazantsev A.V., Proskuryakova M.V., Kazakova E.S., Osina N.A., Shvidenko I.G., Mikerov A.N. Antibiotic Resistance of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections at the Urological Inpatient Facility of the Saratov Clinical Hospital. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:82–89. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-82-89

Received 16.09.2022. Accepted 20.09.2022.

Kazantsev A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1790-0411>

Proskuryakova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7171-855X>

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

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) – одни из наиболее распространенных и часто встречающихся заболеваний, обусловленных патогенами бактериальной природы. В этиологической структуре возбудителей ИМП преобладает уропатогенная *Escherichia coli* (УПЭК), которая вызывает до 90 % внегоспитальных и до 50 % госпитальных случаев ИМП [1]. В качестве одного из эффективных способов лечения ИМП рассматривается применение антибактериальных препаратов (АБП). Эффективность такой терапии зависит от чувствительности возбудителя к используемым АБП. Определенные опасения вызывает отмечаемое в настоящее время снижение чувствительности к АБП, а также выявление штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, встречаемое и среди представителей УПЭК [2].

По классификации, предложенной О. Clermont *et al.* [3] и Р. Escobar-Paramo *et al.* [4], культуры *E. coli* разделяют на четыре основные филогенетические группы: А, В1, В2 и D, – при этом группы А, В2, D подразделяются на подгруппы А₀ и А₁, В2₂ и В2₃, D₁ и D₂ соответственно. Наиболее часто встречающиеся при ИМП штаммы УПЭК принадлежат в основном к филогенетической группе В2 и реже к группе D. Данные группы имеют больше детерминант вирулентности, которые опосредуют развитие инфекционного процесса с помощью токсинов, систем утилизации железа (сидерофоров), факторов адгезии, устойчивости к действию иммунной системы и др. [5, 6]. Филогенетические группы А, В1 и D обычно принадлежат к штаммам, выделенным при заболеваниях внекишечной локализации, и в этиологии ИМП имеют меньшую выраженность.

Штаммы УПЭК относятся к O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75 и O83-серогруппам и характеризуются определенным профилем факторов вирулентности, а также резистентностью/чувствительностью к АБП [1, 7–9]. Кроме того, увеличивается доля штаммов, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), а также распространение штаммов, резистентных к карбапенемам [10]. В настоящее время появляются данные о распространении у штаммов УПЭК гена *mcr*, кодирующего синтез резистентности к колистину – АБП резерва, используемого для лечения пациентов с множественной лекарственной устойчивостью [11]. Однако вопреки указанным фактам в доступной нам литературе отсутствуют данные о распространении антибиотикорезистент-

ных штаммов патогена среди пациентов урологических стационаров как на территории Саратова, так и Саратовской области. Актуальным являются исследования, направленные на локальный мониторинг антибиотикорезистентности штаммов УПЭК с целью коррекции эмпирической антибактериальной терапии и повышения качества лечения пациентов с ИМП.

Цель работы – изучить профиль антибиотикорезистентности уропатогенных штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с инфекциями мочевыводящих путей в урологическом стационаре клинической больницы Саратова в зависимости от принадлежности к филогенетическим группам и подгруппам, O-серогруппам.

Материалы и методы

Культуры *E. coli* (n=102) выделены из образцов мочи от 102 пациентов (мужчины – 28 %, женщины – 72 %) при поступлении в урологические отделения ГУЗ «Саратовская городская клиническая больница № 8» в 2017–2018 гг.

Штаммы *E. coli* выделены из образцов мочи пациентов в диагностически значимом титре (степень бактериурии $\geq 10^5$ КОЕ/мл) с одним из следующих диагнозов: калькулезный пиелонефрит, острый пиелонефрит, хронический пиелонефрит, острый цистит, хронический цистит, а также другими инфекционно-воспалительными заболеваниями мочевыводящей системы без установленной локализации.

Проведение исследований одобрено решением этической комиссии Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского (протокол от 07.06.2016 № 9). Информированное согласие на участие в исследовании получено от всех пациентов.

Видовую идентификацию культур *E. coli* осуществляли с использованием автоматического бактериологического анализатора Vitek 2 Compact (Biomerieux, Франция), применяя карты Vitek 2 Compact Gram-Negative identification card (GN), а также тест-систем API 20E (Biomerieux, Франция), с учетом результатов на микробиологическом анализаторе Biomic V3 (Giles Scientific, США).

Хранение культур осуществляли в протеозо-пептоне (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Индия) с добавлением 50 % глицерина при температуре минус 40 °С.

Исследование антибиотикорезистентности УПЭК осуществляли диско-диффузионным методом в соответствии с МУК 4.2.1890-04 на агаре Мюллера – Хинтона (HiMedia Laboratories, Индия).

В работе использовали набор дисков с АБП (HiMedia, Индия), содержащих в качестве действующего вещества: ампициллин (10 мкг), амоксициллин (10 мкг), амоксициллин/клавуланат (20/10 мкг), пиперацillin (75 мкг), цефиксим (5 мкг), цефотаксим (30 мкг), цефтазидим (30 мкг), цефтриаксон (30 мкг), цефуоксим (30 мкг), меропенем (10 мкг), азтреонам (30 мкг), ципрофлоксацин (5 мкг), левофлоксацин (5 мкг), моксифлоксацин (5 мкг), офлоксацин (5 мкг), амикацин (30 мкг), гентамицин (10 мкг), нетилмицин (30 мкг), тобрамицин (10 мкг), доксициклин (30 мкг), тетрациклин (30 мкг), хлорамфеникол (30 мкг), фосфомицин (200 мкг), нитрофурантоин (300 мкг), триметоприм-сульфаметоксазол (1,25–23,75 мкг). Оценку спектра чувствительности/резистентности к АБП оценивали в соответствии с клиническими рекомендациями [12].

Для выявления продукции бета-лактамаз расширенного спектра использовали метод двойных дисков согласно МУК 4.2.1890-04. Для этого в центр чашки Петри, содержащей агар Мюллера – Хинтона, помещали диск с амоксициллин-клавуланатом (20–10 мкг), с обеих сторон от диска на расстоянии 20 и 30 мм раскладывали диски с цефтазидимом (30 мкг) и цефотаксимом (30 мкг). Учет результатов оценивали визуально через 16–20 часов после инкубации чашки в термостате при температуре (35±1) °С. При обнаружении у изучаемых штаммов УПЭК продукции БЛРС зона вокруг диска с цефалоспоридами III поколения оказывалась «втянутой» в сторону диска с амоксициллин-клавуланатом.

Для определения продукции карбапенемаз использовали СИМ-тест, основанный на ферментативном гидролизе карбапенема при инкубации диска с меропенемом (10 мкг) [13].

В качестве контрольных при определении чувствительности к АБП применяли штаммы *E. coli* ATCC 25922, для контроля продукции БЛРС – штамм *Klebsiella pneumonia* ATCC 70060, продуцирующий БЛРС. Для контроля продукции карбапенема использовали *E. coli* ATCC 25922. Контрольные штаммы получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов Российского противочумного института «Микроб».

Выделение ДНК осуществляли с использованием набора реагентов «ДНК-Сорб-В» (ЦНИИ эпидемиологии, Россия) согласно инструкции производителя.

Принадлежность штаммов УПЭК к филогенетическим группам и подгруппам A, B1, B2, B2₂, B2₃, D₁, D₂ определяли с помощью детекции генов *chuA*, *jyaA*, *TspE4.C2* согласно [3, 4].

Для выявления О-серогрупп (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75, O83) возбудителя использовали ПЦР с праймерами, детектирующими фрагменты генов *wzx*, *wzy* и *orf469* [14].

Детекцию генов *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, кодирующих белки резистентности к колистину, осуществляли согласно рекомендациям [15].

Аmplифицированные фрагменты изучаемых генов визуализировали методом электрофореза в 2 % агарозном геле в присутствии бромида этидия.

Результаты и обсуждение

Установлено, что все исследованные штаммы уropатогенных *E. coli* в той или иной мере обладали резистентностью к АБП (табл. 1). У двух штаммов патогена отмечена устойчивость только к одному из АБП: в одном случае – к меропенему, во втором – к нитрофурантоину.

Резистентность изученных штаммов уropатогенных *E. coli* к группе пенициллинов составила от 53,9 до 84,3 %, к цефалоспоридам – от 61,8 до 71,6 %, азтреонаму – 70,6 %, фторхинолонам – от 67,6 до 85,3 %, тетрациклинам – от 57,8 до 63,7 %. К другим антимикробным препаратам (хлорамфеникол, фосфомицин, нитрофурантоин и триметоприм-сульфаметоксазол) устойчивость УПЭК варьировала от высокой (у фосфомицина – 70,6 %) до самой низкой (у нитрофурантоина – 1 %). Низкая резистентность также отмечена к группе карбапенемов, представленных меропенемом (1 %).

Таким образом, по результатам определения резистентности к АБП установлено, что максимальная антибиотикорезистентность УПЭК выявлена к следующим препаратам: ципрофлоксацин (85,3 %), ампициллин (84,3 %), амоксициллин (83,3 %), моксифлоксацин (82,4 %), пиперацillin (77,5 %), офлоксацин (73,5 %), цефуоксим (71,6 %), цефтриаксон (70,6 %), азтреонам (70,6 %), фосфомицин (70,6 %), цефотаксим (68,6 %), триметоприм-сульфаметоксазол (68,6 %). Наиболее высокая чувствительность уropатогенных *E. coli* среди выбранного для исследований набора АБП различных групп выявлена к меропенему и нитрофурантоину (99,0 %).

Первоначальный скрининг штаммов УПЭК с целью установления возможной продукции БЛРС показал, что для 72 культур (70,6 %) характерно проявление резистентности к одному или нескольким представителям группы цефалоспоринов (цефотаксиму, цефтазидиму, цефтриаксону). Фенотипическое подтверждение наличия продукции БЛРС методом двойных дисков установлено для 69 штаммов УПЭК (67,6 %), что согласуется с представленными литературными данными [16, 17].

Изученные нами штаммы уropатогенных *E. coli* принадлежали к пяти филогенетическим группам и подгруппам: A₁ – 17 штаммов, B1 – 11, B2₃ – 54, D₁ – 9, D₂ – 11. Культуры УПЭК филогенетической подгруппы A₁ принадлежали по 1 штамму к O7 и O8-серогруппам, у 15 штаммов серогруппу установить не удалось; B1 – 2 штамма O8-серогруппы, у 9 штаммов серогруппа не определена; B2₃ – 33 штамма O25-серогруппы, по 2 штамма O1, O75 и

Таблица 1 / Table 1

Чувствительность к антибактериальным препаратам штаммов уropathогенных *E. coli*, выделенных из мочи пациентов с инфекциями мочевыводящих путей на территории Саратова

Sensitivity to antibacterial preparations in strains of uropathogenic *E. coli* isolated from the urine of patients with urinary tract infections in the territory of the Saratov city

Антибактериальный препарат Antibacterial preparation	Количество штаммов Number of strains		
	чувствительных, абс. (%) sensitive to, abs. (%)	резистентных, абс. (%) resistant to, abs. (%)	умеренно-устойчивых*, абс. (%) moderately resistant to*, abs. (%)
Пенициллины / Penicillins			
Ампициллин / Ampicillin	16 (15,7)	86 (84,3)	–
Амоксициллин / Amoxicillin	17 (16,7)	85 (83,3)	–
Амоксициллин-клавуланат / Amoxicillin-clavulanate	47 (46,1)	55 (53,9)	–
Пиперацillin / Piperacillin	19 (18,6)	79 (77,5)	4 (3,9)
Цефалоспорины / Cephalosporins			
Цефиксим / Cefixime	34 (33,3)	68 (66,7)	–
Цефотаксим / Cefotaxime	31 (30,4)	70 (68,6)	1 (1,0)
Цефтазидим / Cefotazidime	30 (29,4)	63 (61,8)	9 (8,8)
Цефтриаксон / Ceftriaxone	21 (20,6)	72 (70,6)	9 (8,8)
Цефуросксим / Cefuroxime	29 (28,4)	73 (71,6)	–
Карбапенемы / Carbapenems			
Меропенем / Meropenem	90 (88,2)	1 (1,0)	11 (10,8)
Монобактамы / Monobactams			
Азтреонам / Aztreonam	21 (20,6)	72 (70,6)	9 (8,8)
Фторхинолоны / Fluoroquinolones			
Ципрофлоксацин / Ciprofloxacin	12 (11,8)	87 (85,3)	3 (2,9)
Левифлоксацин / Levofloxacin	22 (21,6)	69 (67,6)	11 (10,8)
Моксифлоксацин / Moxifloxacin	18 (17,6)	84 (82,4)	–
Офлоксацин / Ofloxacin	23 (22,5)	75 (73,5)	4 (3,9)
Аминогликозиды / Aminoglycosides			
Амикацин / Amikacin	62 (60,8)	18 (17,6)	22 (21,6)
Гентамицин / Gentamicin	47 (46,1)	40 (39,2)	15 (14,7)
Нетилимидин / Netilmicin	59 (57,8)	34 (33,3)	9 (8,8)
Тобрамицин / Tobramycin	29 (28,4)	57 (55,9)	16 (15,7)
Тетрациклины / Tetracyclines			
Доксициклин / Doxycycline	34 (33,3)	59 (57,8)	9 (8,8)
Тетрациклин / Tetracycline	37 (36,3)	65 (63,7)	–
Другие антимикробные препараты / Other antimicrobial preparations			
Хлорамфеникол / Chloramphenicol	79 (77,5)	23 (22,5)	–
Фосфомицин / Fosfomicin	30 (29,4)	72 (70,6)	–
Нитрофурантоин / Nitrofurantoin	101 (99,0)	1 (1,0)	–
Триметоприм-сульфаметоксазол / Trimethoprim-sulfamethoxazole	28 (27,5)	70 (68,6)	4 (3,9)

Примечание: * к категории умеренно устойчивых отнесены антибактериальные препараты, обладающие терапевтическим эффектом при более высоких (по сравнению с обычными) концентрациях антибиотика [12].

Note: * the moderately resistant category includes antibacterial drugs that have a therapeutic effect at higher (compared to conventional) antibiotic concentrations [12].

неустановленных О-серогрупп, по 1 штамму O18 и O83, 5 штаммов O6 и 8 культур O2-серогрупп; D₁ – 2 штамма O15-серогруппы, 3 штамма – O1, 4 культуры – не детектируемые О-серогруппы; D₂ – 1 штамм O2-серогруппы и 10 культур с неустановленными в данном исследовании О-серогруппами.

Резистентность штаммов патогена различных филогенетических групп и подгрупп к АБП имела

определенные отличия (табл. 2). К АБП пеницилинового ряда (ампициллин, амоксициллин, пиперацillin) резистентны 81,8–100 % исследованных культур возбудителя филогенетических групп и подгрупп B1, B2₃, D₁, D₂. Для подгруппы A₁ этот показатель ниже – 47,1–58,8 %. В то же время к препарату из этого класса амоксициллин-клавуланату в высокой степени были резистенты только штаммы фило-

Таблица 2 / Table 2

Резистентность к антибактериальным препаратам штаммов уropатогенных *E. coli*, относящихся к различным филогенетическим группам и подгруппамResistance to antibacterial preparations of uropathogenic *E. coli* strains belonging to different phylogenetic groups and subgroups

Антибактериальный препарат Antibacterial preparation	Количество резистентных штаммов уropатогенных <i>E. coli</i> , относящихся к различным филогенетическим группам и подгруппам, % Number of resistant strains of uropathogenic <i>E. coli</i> belonging to different phylogenetic groups and subgroups, %				
	A ₁	B1	B2 ₃	D ₁	D ₂
	n=17	n=11	n=54	n=9	n=11
Пенициллины / Penicillins					
Ампициллин / Ampicillin	58,8	100,0	88,9	88,9	81,8
Амоксициллин / Amoxicillin	58,8	100,0	87,0	88,9	81,8
Амоксициллин-клавуланат / Amoxicillin-clavulanate	17,6	54,5	66,7	22,2	72,7
Пиперациллин / Piperacillin	47,1	100,0	83,3	66,7	81,8
Цефалоспорины / Cephalosporins					
Цефиксим / Cefixime	47,1	63,6	77,8	44,4	63,6
Цефотаксим / Cefotaxime	70,6	90,9	70,4	22,2	72,7
Цефтазидим / Cefprozidime	41,2	81,8	68,5	22,2	72,7
Цефтриаксон / Ceftriaxone	47,1	72,7	81,5	33,3	81,8
Цефуросим / Cefuroxime	47,1	81,8	83,3	33,3	72,7
Карбапенемы / Carbapenems					
Меропенем / Meropenem	0	0	1,9	0	0
Монобактамы / Monobactams					
Азтреонам / Aztreonam	47,1	81,8	79,6	33,3	81,8
Фторхинолоны / Fluoroquinolones					
Ципрофлоксацин / Ciprofloxacin	70,6	81,8	90,7	66,7	100,0
Левифлоксацин / Levofloxacin	64,7	81,8	68,5	33,3	81,8
Моксифлоксацин / Moxifloxacin	76,5	81,8	85,2	66,7	90,9
Офлоксацин / Ofloxacin	70,6	72,7	77,8	55,6	72,7
Аминогликозиды / Aminoglycosides					
Амикацин / Amikacin	11,8	9,1	20,4	11,1	27,3
Гентамицин / Gentamicin	29,4	45,5	40,7	11,1	63,6
Нетилмицин / Netilmicin	41,2	9,1	33,3	11,1	63,6
Тобрамицин / Tobramycin	47,1	54,5	61,1	33,3	63,6
Тетрациклины / Tetracyclines					
Доксициклин / Doxycycline	70,6	81,8	44,4	66,7	72,7
Тетрациклин / Tetracycline	52,9	63,6	68,5	66,7	54,5
Другие антимикробные препараты / Other antimicrobial preparations					
Хлорамфеникол / Chloramphenicol	23,5	36,4	13,0	22,2	54,5
Фосфомицин / Fosfomycin	82,4	27,3	70,4	77,8	90,9
Нитрофурантоин / Nitrofurantoin	0	0	1,9	0	0
Триметоприм-сульфаметоксазол / Trimethoprim-sulfamethoxazole	70,6	81,8	63,0	66,7	81,8
Бета-лактамазы расширенного спектра / Extended-spectrum beta-lactamases	52,9	72,7	75,9	22,2	81,8

генетических подгрупп B2₃ и D₂, тогда как представители B1 составили 54,5 %, A₁ – 17,0 %.

Картина резистентности к цефалоспорином была несколько иной. К данному классу АПБ устойчивы 63,6–90,9 % штаммов уropатогенных *E. coli* филогенетических групп B1, B2₃, D₂; 22,2–47,1 % – групп A₁ и D₁. Аналогичная зависимость отмечена по отношению к азтреонаму. Для всех филогенетических групп патогена характерна высокая резистентность к фторхинолонам – 64,7–100 %, тетраци-

клином – 52,9–81,8 %, триметоприм-сульфаметоксазолу – 63,0–81,8 %. Исключением были представители УПЭК подгруппы D₁, чувствительные к левофлоксацину.

Резистентность к аминогликозидам у штаммов патогена различных филогенетических подгрупп варьировала: D₁ – в большинстве случаев 11,1 %; D₂ – 63,6 %; A₁, B1, B2₃ – от 9,1 до 54,5 % в зависимости от вида препарата. Практически все фило- группы (кроме D₂) изученных штаммов уropатоген-

ных *E. coli* умеренно устойчивы к хлорамфениколу (13,0–36,4 %).

Исходя из полученных данных видно, что для штаммов патогена филогенетической подгруппы B₂ и группы B1 характерна высокая резистентность к пенициллинам (кроме амоксициллин-клавуланата), цефалоспорином, монобактамам, фторхинолонам, тобрамицину, триметоприм-сульфаметоксазолу, умеренно – к аминогликозидам и хлорамфениколу. По отношению к фосфомицину устойчивость для этих групп была высокой и низкой соответственно. Рядом исследователей отмечены аналогичные результаты по преобладающей частоте встречаемости резистентности к АБП у представителей УПЭК филогенетической группы B2 [5, 18], а также подгруппы B₂ [19].

В то же время для подгруппы D₁ спектр резистентности отличался: высокая устойчивость к пенициллинам (кроме амоксициллин-клавуланата) и фосфомицину, умеренно – к цефалоспорином, фторхинолонам (кроме левофлоксацина), тетрациклинам и триметоприм-сульфаметоксазолу. Для штаммов

уропатогенных *E. coli* подгруппы D₂ характерна высокая устойчивость к пенициллинам, цефалоспорином, монобактамам, фторхинолонам, фосфомицину, триметоприм-сульфаметоксазолу, умеренно – к аминогликозидам, тетрацилину, хлорамфениколу. Наибольшие отличия по резистентности к АБП отмечены для штаммов патогена филогенетической подгруппы A₁: умеренно устойчивы практически ко все классам препаратов (кроме фторхинолонов), фосфомицину, триметоприм-сульфаметоксазолу.

Полученные результаты указывают на необходимость детального изучения геномов штаммов уropатогенных *E. coli* разных филогенетических групп с целью выявления генетических маркеров, определяющих различия в устойчивости этих групп к различным классам АБП. Среди возможных причин могут быть мутации в ряде генов, характерные для каждой филогенетической группы.

Анализ результатов определения резистентности к АБП штаммов УПЭК различных серологических групп представлен в табл. 3.

Таблица 3 / Table 3

Резистентность к антибактериальным препаратам штаммов уropатогенных *E. coli*, принадлежащих к различным серогруппам

Resistance to antibacterial preparations of uropathogenic *E. coli* belonging to different serogroups

Антибактериальный препарат Antibacterial preparation	Количество резистентных к антибактериальным препаратам штаммов уropатогенных <i>E. coli</i> , относящихся к различным серогруппам, % The number of antibiotic-resistant strains of uropathogenic <i>E. coli</i> belonging to different serogroups, %						
	O1	O2	O6	O8	O15	O25	O75
	n=5	n=9	n=5	n=3	n=2	n=33	n=2
1	2	3	4	5	6	7	8
Пенициллины / Penicillins							
Ампициллин / Ampicillin	100,0	88,9	60,0	100,0	100,0	100,0	50,0
Амоксициллин / Amoxicillin	100,0	88,9	40,0	100,0	100,0	100,0	50,0
Амоксициллин-клавуланат / Amoxicillin-clavulanate	40,0	33,3	40,0	33,3	0,0	81,8	50,0
Пиперацillin / Piperacillin	60,0	88,9	40,0	100,0	50,0	97,0	50,0
Цефалоспорины / Cephalosporins							
Цефиксим / Cefixime	60,0	88,9	0,0	66,7	0,0	97,0	0,0
Цефотаксим / Cefotaxime	40,0	11,1	40,0	33,3	0,0	97,0	50,0
Цефтазидим / Ceftazidime	60,0	44,4	20,0	66,7	0,0	81,8	50,0
Цефтриаксон / Ceftriaxone	60,0	88,9	20,0	66,7	0,0	97,0	0,0
Цефуоксим / Cefuroxime	60,0	88,9	40,0	66,7	0,0	97,0	50,0
Карбапенемы / Carbapenems							
Меропенем / Meropenem	0,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Монобактамы / Monobactams							
Азтреонам / Aztreonam	60,0	100,0	40,0	66,7	0,0	90,9	0,0
Фторхинолоны / Fluoroquinolones							
Ципрофлоксацин / Ciprofloxacin	40,0	88,9	60,0	66,7	50,0	100,0	50,0
Левофлоксацин / Levofloxacin	40,0	11,1	40,0	66,7	0,0	100,0	0,0
Моксифлоксацин / Moxifloxacin	60,0	55,6	60,0	66,7	50,0	100,0	50,0
Офлоксацин / Ofloxacin	60,0	66,7	0,0	66,7	0,0	93,9	50,0
Аминогликозиды / Aminoglycosides							
Амикацин / Amikacin	20,0	11,1	40,0	33,3	0,0	18,2	0,0
Гентамицин / Gentamicin	20,0	11,1	0,0	33,3	0,0	54,5	0,0
Нетилмицин / Netilmicin	20,0	0,0	20,0	33,3	0,0	48,5	0,0
Тобрамицин / Tobramycin	20,0	0,0	40,0	66,7	0,0	81,8	50,0

Окончание табл. 3 / Ending of table 3

1	2	3	4	5	6	7	8
Тетрациклины / Tetracyclines							
Доксициклин / Doxycycline	40,0	0,0	80,0	100,0	100,0	54,5	50,0
Тетрациклин / Tetracycline	40,0	55,6	40,0	100,0	100,0	81,8	100,0
Другие антимикробные препараты / Other antimicrobial preparations							
Хлорамфеникол / Chloramphenicol	40,0	44,4	0,0	66,7	0,0	6,1	50,0
Фосфомицин / Fosfomycin	60,0	55,6	80,0	66,7	50,0	69,7	100,0
Нитрофурантоин / Nitrofurantoin	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0
Триметоприм-сульфаметоксазол / Trimethoprim-sulfamethoxazole	80,0	66,7	20,0	100,0	100,0	75,8	0,0
Бета-лактамазы расширенного спектра / Extended-spectrum beta-lactamases	60,0	66,6	40,0	0	0	53,7	50,0

Наибольшая частота встречаемости резистентности к АБП, включая нитрофурантоин, выявлена у штаммов *E. coli*, принадлежащих к O25-серогруппе и филогенетической группе B2₃. По литературным данным, штаммы УПЭК, принадлежащие к O25-серогруппе, обладают большей частотой встречаемости резистентности к АБП [7, 9]. У штаммов O6-серогруппы выявлена резистентность к меропенему.

В 3 штаммах (2,9 %) УПЭК выявлено наличие генов *mcr-1* и *mcr-2*, кодирующих белки, детерминирующие резистентность к колистину. У данных штаммов, принадлежащих к филогенетической подгруппе A₁, с помощью молекулярно-генетических методов установить принадлежность к O-серогруппам не удалось. На территории РФ ген *mcr-1* детектирован у 2 штаммов УПЭК, принадлежащих к O11-серогруппе [1].

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют, что штаммы УПЭК, выделенные из мочи пациентов, находящихся на стационарном лечении в урологическом стационаре клинической больницы Саратова, характеризуются высокой резистентностью к большинству классов АБП. Спектры резистентности изученных штаммов патогена, принадлежащих различным филогенетическим группам и подгруппам A₁, B1, B2₃, D₁, D₂ и серогруппам (O1, O2, O6, O7, O8, O15, O18, O25, O75, O83), имеют определенные отличия. Штаммы УПЭК, обладающие высокой резистентностью (до 100,0 %), принадлежали к филогенетической подгруппе B2₃, основными представителями которой являются культуры наиболее часто встречающейся O25-серогруппы. В исследуемой выборке штаммов УПЭК с использованием метода двойных дисков в 67,6 % случаев выявлена продукция БЛРС. У трех исследованных уropatогенных штаммов *E. coli* впервые на территории Саратова и Саратовской области выявлены гены *mcr-1* и *mcr-2*, кодирующие резистентность к колистину – препарату резерва, используемому для лечения заболеваний, вызванных полирезистентными штаммами. Полученные данные свидетельствуют о необходимости постоянного мониторинга чувствительности/резистентности к

антимикробным препаратам штаммов УПЭК с целью оптимизации назначения лекарственных препаратов, а также детального изучения генома патогена для оценки эволюционных преобразований.

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

Список литературы

1. Слукин П.В., Асташкин Е.И., Асланян Е.М., Ершова М.Г., Полетаева Е.Д., Светоч Э.А., Шепелин А.П., Фурсова Н.К. Характеристика вирулентных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с урологической инфекцией. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(6):671–84. DOI: 10.36233/0372-9311-134.
2. Kot B. Antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli*. *Pol. J. Microbiol.* 2019; 68(4):403–15. DOI: 10.33073/pjm-2019-048.
3. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(10):4555–8. DOI: 10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000.
4. Escobar-Páramo P., Grenet K., Le Menac'h A., Rode L., Salgado E., Amorin C., Gouriou S., Picard B., Rahimy M.C., Andreumont A., Denamur E., Ruimy R. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(9):5698–700. DOI: 10.1128/AEM.70.9.5698-5700.2004.
5. Hyun M., Lee J.Y., Kim H. Differences of virulence factors, and antimicrobial susceptibility according to phylogenetic group in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from Korean patients. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2021; 20(1):77. DOI: 10.1186/s12941-021-00481-4.
6. Dadi B.R., Abebe T., Zhang L., Mihret A., Abebe W., Amogne W. Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1):108. DOI: 10.1186/s12879-020-4844-z.
7. Mohammed E.J., Allami M., Sharifmoghaddam M.R., Bahreini M. Relationship between antibiotic resistance patterns and O-serogroups in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from Iraqi patients. *Jundishapur J. Microbiol.* 2021; 14(8):e118833. DOI: 10.5812/jjm.118833.
8. Park M., Kim S.M. Comparison of O-serogroups, virulence factors and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections between 2 time periods of 1989 and 2010–2014 at Gangwon Province in Korea. *Biomedical Science Letters*. 2022; 28(2):127–36. DOI: 10.15616/BSL.2022.28.2.127.
9. Momtaz H., Karimian A., Madani M., Safarpour Dehkordi F., Ranjbar R., Sarshar M., Souod N. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2013; 12:8. DOI: 10.1186/1476-0711-12-8.
10. Halaji M., Shahidi S., Atapour A., Ataei B., Feizi A., Havaei S.A. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* among Iranian kidney transplant patients. *Infect. Drug Resist.* 2020; 13:1429–37. DOI: 10.2147/IDR.S248572.
11. Шедько Е.Д., Тимошина О.Ю., Азизов И.С. Молекулярная эпидемиология генов группы *mcr*. *Клиническая микро-*

биология и антимикробная химиотерапия. 2020; 22(4):287–300. DOI: 10.36488/cmac.2020.4.287-300.

12. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия-2018-03). [Электронный ресурс]. URL: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2018.pdf?ysclid=I93wjztctq67148516>.

13. Van der Zwaluw K., de Haan A., Pluister G.N., Bootsma H.J., de Neeling A.J., Schouls L.M. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PloS One*. 2015; 10(3):e0123690. DOI: 10.1371/journal.pone.0123690.

14. Li D., Liu B., Chen M., Guo D., Guo X., Liu F., Feng L., Wang L.A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. *J. Microbiol. Methods*. 2010; 82(1):71–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.04.008.

15. Osei Sekyere J. Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *MicrobiologyOpen*. 2019; 8(4):e00682. DOI: 10.1002/mbo3.682.

16. Hasan S.M., Ibrahim K.S. Molecular characterization of extended spectrum β -lactamase (ESBL) and virulence gene-factors in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in children in Duhok City, Kurdistan Region, Iraq. *Antibiotics (Basel)*. 2022; 11(9):1246. DOI: 10.3390/antibiotics11091246.

17. Zhang L., Li F., Li X. Studies on virulence and extended-spectrum β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolates and therapeutic effect of fosfomycin in acute pyelonephritis mice. *Biomed Res. Int*. 2022; 2022:8334153. DOI: 10.1155/2022/8334153.

18. Allami M., Bahreini M., Sharifmoghdam M.R. Antibiotic resistance, phylogenetic typing, and virulence genes profile analysis of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients in southern Iraq. *J. Appl. Genetics*. 2022; 63(2):401–12. DOI: 10.1007/s13353-022-00683-2.

19. Amiri M., Jajarmi M., Ghanbarpour R. Prevalence of resistance to quinolone and fluoroquinolone antibiotics and screening of qnr genes among *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection. *Int. J. Enteric Pathog.* 2017; 5(4):100–5. DOI: 10.15171/ijep.2017.24.

References

1. Slukin P.V., Astashkin E.I., Aslanyan E.M., Ershova M.G., Poletaeva E.D., Svetoch E.A., Shepelin A.P., Fursova N.K. [Characterization of virulent *Escherichia coli* strains isolated from patients with urological infection]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2021; 98(6):671–84. DOI: 10.36233/0372-9311-134.

2. Kot B. Antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli*. *Pol. J. Microbiol.* 2019; 68(4):403–15. DOI: 10.33073/pjm-2019-048.

3. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(10):4555–8. DOI: 10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000.

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

5. Hyun M., Lee J.Y., Kim H. Differences of virulence factors, and antimicrobial susceptibility according to phylogenetic group in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from Korean patients. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2021; 20(1):77. DOI: 10.1186/s12941-021-00481-4.

6. Dadi B.R., Abebe T., Zhang L., Mihret A., Abebe W., Amogne W. Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1):108. DOI: 10.1186/s12879-020-4844-z.

7. Mohammed E.J., Allami M., Sharifmoghdam M.R., Bahreini M. Relationship between antibiotic resistance patterns and O-serogroups in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from Iraqi patients. *Jundishapur J. Microbiol.* 2021; 14(8):e118833. DOI: 10.5812/jjm.118833.

8. Park M., Kim S.M. Comparison of O-serogroups, virulence factors and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections between 2 time periods of 1989 and 2010–2014 at Gangwon Province in Korea. *Biomedical Science Letters*. 2022; 28(2):127–36. DOI: 10.15616/BSL.2022.28.2.127.

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

10. Halaji M., Shahidi S., Atapour A., Ataei B., Feizi A., Havaei S.A. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* among Iranian kidney transplant patients. *Infect. Drug Resist.* 2020; 13:1429–37. DOI: 10.2147/IDR.S248572.

11. Shed'ko E.D., Timoshina O.Yu., Azizov I.S. [Molecular epidemiology of mcr gene group]. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya [Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy]*. 2020; 22(4):287–300. DOI: 10.36488/cmac.2020.4.287-300.

12. [Clinical Recommendations “Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs” (edition-2018-03)]. [Internet]. Available from: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2018.pdf?ysclid=I93wjztctq67148516>.

13. Van der Zwaluw K., de Haan A., Pluister G.N., Bootsma H.J., de Neeling A.J., Schouls L.M. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PloS One*. 2015; 10(3):e0123690. DOI: 10.1371/journal.pone.0123690.

14. Li D., Liu B., Chen M., Guo D., Guo X., Liu F., Feng L., Wang L.A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. *J. Microbiol. Methods*. 2010; 82(1):71–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.04.008.

15. Osei Sekyere J. Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *MicrobiologyOpen*. 2019; 8(4):e00682. DOI: 10.1002/mbo3.682.

16. Hasan S.M., Ibrahim K.S. Molecular characterization of extended spectrum β -lactamase (ESBL) and virulence gene-factors in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in children in Duhok City, Kurdistan Region, Iraq. *Antibiotics (Basel)*. 2022; 11(9):1246. DOI: 10.3390/antibiotics11091246.

17. Zhang L., Li F., Li X. Studies on virulence and extended-spectrum β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolates and therapeutic effect of fosfomycin in acute pyelonephritis mice. *Biomed Res. Int*. 2022; 2022:8334153. DOI: 10.1155/2022/8334153.

18. Allami M., Bahreini M., Sharifmoghdam M.R. Antibiotic resistance, phylogenetic typing, and virulence genes profile analysis of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients in southern Iraq. *J. Appl. Genetics*. 2022; 63(2):401–12. DOI: 10.1007/s13353-022-00683-2.

19. Amiri M., Jajarmi M., Ghanbarpour R. Prevalence of resistance to quinolone and fluoroquinolone antibiotics and screening of qnr genes among *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection. *Int. J. Enteric Pathog.* 2017; 5(4):100–5. DOI: 10.15171/ijep.2017.24.

Authors:

Kazantsev A.V., Proskuryakova M.V., Kazakova E.S., Osina N.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Shvidenko I.G. Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky. 112, Bolshaya Kazachia St., 410012, Saratov, Russian Federation. E-mail: meduniv@sgmu.ru.

Mikero A.N. Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky; 112, Bolshaya Kazachia St., 410012, Saratov, Russian Federation; e-mail: meduniv@sgmu.ru. Saratov Medical Scientific Center of Hygiene at the Federal Scientific Center of Medical and Preventive Health Risk Management Technologies; block 1a, building 1, Zarechnaya St., Saratov, 410022, Russian Federation; e-mail: mail@smnecg.ru.

Об авторах:

Казанцев А.В., Проскурякова М.В., Казакова Е.С., Осина Н.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

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

Микеров А.Н. Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского; Российская Федерация, 410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112; e-mail: meduniv@sgmu.ru. Саратовский медицинский научный центр гигиены ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; Российская Федерация, 410022, Саратовская область, Саратов, ул. Заречная, зд. 1а, стр. 1. E-mail: mail@smnecg.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-90-94

УДК 614.4(597)

Ж.А. Касьян¹, Le Thi Lan Anh², И.Н. Шарова¹, Vo Viet Cuong², Е.Г. Оглодин¹, Trinh Van Toan², С.Н. Голубев¹, М.В. Проскурякова¹, Bui Thi Lan Anh², Hoang Duc Hau², Dang Thi Viet Huong², Pham Thi Ha Giang², Duong Van Nghia², Bui Thi Thanh Nga², М.Н. Ляпин¹, С.А. Щербак¹

Опыт использования мобильной лаборатории мониторинга и диагностики в Социалистической Республике Вьетнам

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

²Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам

Представлен опыт задействования мобильной лаборатории мониторинга и диагностики (МЛМД), переданной Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Социалистической Республике Вьетнам в рамках реализации программ сотрудничества по противодействию инфекционным болезням, при проведении эпизоотологического обследования северных провинций Вьетнама. Использование МЛМД позволило получить новые сведения о циркуляции возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней на территории Вьетнама, а также обеспечить необходимые условия для проведения исследований с использованием методов экспресс- и ускоренной диагностики, бактериологического анализа, выполнения полного цикла работ – от поступления проб до обеззараживания и деструкции инфицированного материала с соблюдением требований биологической безопасности в полевых условиях. Показана эффективность использования мобильных лабораторий при реагировании на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера как для усиления стационарных лабораторных баз, так и для организации диагностических исследований в отдаленных регионах Вьетнама. Использование МЛМД для диагностики COVID-19 явилось эффективной составляющей противодействия новой коронавирусной инфекции во Вьетнаме и существенно повысило объем тестирования в стране.

Ключевые слова: мобильные лаборатории биологического профиля, чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера, эпизоотологическое обследование территорий, новая коронавирусная инфекция.

Корреспондирующий автор: Касьян Жанетта Андреевна, e-mail: kasyan_zha@mail.ru.

Для цитирования: Касьян Ж.А., Le Thi Lan Anh, Шарова И.Н., Vo Viet Cuong, Оглодин Е.Г., Trinh Van Toan, Голубев С.Н., Проскурякова М.В., Bui Thi Lan Anh, Hoang Duc Hau, Dang Thi Viet Huong, Pham Thi Ha Giang, Duong Van Nghia, Bui Thi Thanh Nga, Ляпин М.Н., Щербак С.А. Опыт использования мобильной лаборатории мониторинга и диагностики в Социалистической Республике Вьетнам. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:90–94. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-90-94

Поступила 24.08.2022. Принята к публ. 15.09.2022.

Zh.A. Kas'yan¹, Le Thi Lan Anh², I.N. Sharova¹, Vo Viet Cuong², E.G. Oglochin¹, Trinh Van Toan², S.N. Golubev¹, M.V. Proskuryakova¹, Bui Thi Lan Anh², Hoang Duc Hau², Dang Thi Viet Huong², Pham Thi Ha Giang², Duong Van Nghia², Bui Thi Thanh Nga², M.N. Lyapin¹, S.A. Shcherbakova¹

Experience in Using Mobile Laboratory for Monitoring and Diagnostics in the Socialist Republic of Vietnam

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

²Joint Vietnam-Russia Tropical Science and Technology Research Center, Hanoi, Vietnam

Abstract. The aim was to present the experience of using mobile laboratory for monitoring and diagnostics (MLMD) during the epizootiological monitoring of the northern provinces of Vietnam. MLMD was transferred by Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare to the Socialist Republic of Vietnam as part of implementation of cooperation programs on combating infectious diseases. The use of MLMD made it possible to obtain new information on the circulation of pathogens of natural-focal infectious diseases on the territory of Vietnam. It also provided the necessary conditions for conducting research using methods of express diagnostics, bacteriological analysis, performing a full cycle of work – from the receipt of samples to the disinfection and destruction of infected material in compliance with the requirements of biological safety in the field. The effectiveness of using mobile laboratories in response to the emergencies of sanitary and epidemiological nature, both to strengthen stationary laboratory bases and to organize diagnostic studies in remote regions, has been shown. The use of MLMD for the diagnosis of COVID-19 has been an effective component of countering the new coronavirus infection in Vietnam and significantly increased the volume of testing in the country.

Key words: biological mobile laboratories, emergency situations of sanitary and epidemiological nature, epizootiological survey of territories, new coronavirus infection.

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

Corresponding author: Zhanetta A. Kas'yan, e-mail: kasyan_zha@mail.ru.

Citation: Kas'yan Zh.A., Le Thi Lan Anh, Sharova I.N., Vo Viet Cuong, Oglochin E.G., Trinh Van Toan, Golubev S.N., Proskuryakova M.V., Bui Thi Lan Anh, Hoang Duc Hau, Dang Thi Viet Huong, Pham Thi Ha Giang, Duong Van Nghia, Bui Thi Thanh Nga, Lyapin M.N., Shcherbakova S.A. Experience in Using Mobile Laboratory for Monitoring and Diagnostics in the Socialist Republic of Vietnam. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:90–94. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-90-94

Received 24.08.2022. Accepted 15.09.2022.

Kas'yan Zh.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9828-3277>
Oglodin E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2955-3034>

Proskuryakova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7171-855X>
Shcherbakova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

В Российской Федерации начиная с 2006 г. в рамках деятельности Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) ведутся инновационные разработки по проектированию и созданию мобильных лабораторий биологического профиля различного формата – на базе автошасси и пневмокаркасных модулей [1, 2]. Мобильные лаборатории, разрабатываемые ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, успешно применяются при реагировании на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера [3, 4], при осуществлении мониторинга природных очагов инфекционных болезней на территории Российской Федерации и за рубежом [5], а также при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения массовых мероприятий, в том числе с международным участием [6–8].

Российская Федерация на протяжении многих лет активно сотрудничает с Социалистической Республикой Вьетнам (СРВ) по вопросам противодействия угрозам биологического характера. С момента создания в 1987 г. Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр (Тропический центр) является важнейшим учреждением для обеспечения биологической безопасности, стратегическим партнером и опорной базой для реализации программ сотрудничества по актуальным вопросам обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения между Россией и Вьетнамом в области науки, технологий и изучения инфекционных болезней. Роспотребнадзор при поддержке Правительства Российской Федерации проводит совместные мероприятия, направленные на увеличение потенциала Вьетнама в области выявления, профилактики и реагирования на инфекционные болезни по следующим направлениям: укрепление материально-технической базы, подготовка кадров, выполнение совместных научных работ, проведение экспедиций по мониторингу природных очагов опасных инфекционных болезней.

В рамках реализации программ сотрудничества Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека при поддержке Правительства Российской Федерации в декабре 2018 г. в Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр поставлена мобильная лаборатория мониторинга и диагностики (МЛМД). МЛМД выполнена на базе автошасси КамАЗ-43118, обладающего повышенной проходимостью, и предназначена для проведения эпизоотологического мониторинга природных очагов чумы и других опасных инфекционных болезней на удаленных территориях, усиления стационарных лабораторных баз при возникновении чрезвычайных

ситуаций санитарно-эпидемиологического характера. Лаборатория оборудована системами автономного энергоснабжения, кондиционирования, приточно-вытяжной вентиляции и обеспечивает проведение работ с ПБА I–IV групп патогенности бактериальной и II–IV групп патогенности вирусной природы с использованием методов экспресс-, ускоренной диагностики и бактериологического анализа. Внутри МЛМД разделена на лабораторный блок и технический отсек, изолированный от помещений лаборатории. Помещение лабораторного блока включает в себя: помещение для снятия верхней, надевания рабочей и защитной одежды, душевую, тамбур-шлюз (помещение для снятия защитной одежды), блок микробиологических исследований, шлюзовую камеру. Отличительной особенностью лаборатории является наличие необходимых условий для выполнения полного цикла работ – от поступления проб до обеззараживания и деструкции инфицированного материала. Разработка защищена патентом Российской Федерации на полезную модель от 30.10.2017 № 180216.

Использование МЛМД при проведении эпизоотологического обследования северных провинций Вьетнама. В марте 2019 г. с задействованием МЛМД организована первая совместная экспедиция с целью рекогносцировочного эпизоотологического обследования семи северных провинций Социалистической Республики Вьетнам: Дьенбьен, Лайтяу, Лаокай, Хазянг, Каобанг, Лангшон и Куагнинь [9, 10]. Также в задачи экспедиции входило исследование клинического материала от больных с диагнозом «лихорадка неясной этиологии» из госпиталей семи обследуемых провинций. В состав экспедиционной группы входили специалисты Российского противочумного института «Микроб» и Тропического центра в области эпидемиологии, лабораторной диагностики, зоологии, а также инженер и два водителя. Передислокация лаборатории в каждую из провинций осуществлялась своим ходом. О высокой проходимости МЛМД свидетельствует сложность маршрута на некоторых участках: часть пути пролегла через высокогорные перевалы высотой до 2800 м над уровнем моря с опасными и низкосортными участками дороги, а также значительными расстояниями между административными центрами провинций.

В ходе экспедиционной работы для проведения лабораторных исследований МЛМД дислоцировалась на территории госпиталей административных центров провинций. Конструкция лаборатории позволяла после прибытия в кратчайшие сроки приступить к выполнению работ. При разворачивании лаборатории на площадке осуществлялись выбор точки подключения к стационарной электросети с соответствующими параметрами тока, спуск и подключение штатного дизель-генератора через автомат ввода резерва (АВР). При работе в провинции Хазянг из-за

регулярных отключений электроэнергии мобильная лаборатория работала преимущественно от штатных дизель-генераторов, переход от стационарной сети осуществлялся через щит АВР в автоматическом режиме. В условиях тропического климата с преобладающей дневной температурой воздуха 40–42 °С система кондиционирования воздуха позволяла в автоматическом режиме поддерживать температуру в лабораторном блоке в пределах 23–25 °С.

Все этапы исследования – от обеззараживания материала до учета результатов – осуществлялись в лабораторном блоке МЛМД. Материал для исследования (пробы крови от больных с лихорадкой неясной этиологии из госпиталей, пробы органов мелких млекопитающих и эктопаразитов) из провинций Дьенбьен, Лайтяу, Лаокай, Хазянг, Каобанг доставляли в сосуде Дьюара в течение 1–3 дней. Из провинций Лангшон и Куангнинь в связи с близким расположением МЛМД к местам отлова пробы органов грызунов доставляли в лабораторию в течение 1–2 часов после вскрытия. Исследования проводили с использованием методов ПЦР, ИФА, ИХА. Работу выполняли в боксе микробиологической безопасности (БМБ) II класса и ПЦР-боксе.

В процессе экспедиционной работы проводилось обучение специалистов Тропического центра правилам биологической безопасности при работе с ПБА, принципам работы в мобильной лаборатории, а также методам ПЦР и ИФА. Кроме того, в г. Хазянг проведено два обучающих занятия по теоретическим основам ПЦР и организации ПЦР-диагностики с сотрудниками Центра по контролю за заболеваниями провинции Хазянг.

За время экспедиции в апреле – мае 2019 г. в МЛМД проведен анализ 107 проб крови методом ПЦР, поступивших из госпиталей Дьенбьен, Лайтяу, Лаокай, Хазянг, Каобанг с целью выявления РНК вирусов лихорадок денге, Западного Нила (ЛЗН), малярийного плазмодия. В ходе исследований в одной пробе обнаружена РНК вируса денге I типа. В этой же пробе методом ИФА выявлены IgG к вирусу денге. Часть проб крови, в зависимости от имеющегося клинического и эпидемиологического анамнеза, исследованы на наличие РНК возбудителей лихорадки Ку, Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ), лептоспироза, геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), ДНК риккетсий группы пятнистых лихорадок. Маркеры указанных возбудителей не выявлены.

Кроме того, проведено исследование 644 проб органов и крови мелких млекопитающих с целью выявления маркеров возбудителей чумы, туляремии, лихорадки Ку, псевдотуберкулеза, лептоспироза, лихорадок ЛЗН, Ласса, КГЛ, ГЛПС, а также исследование 40 проб эктопаразитов (клещей, блох) на наличие ДНК возбудителей чумы, туляремии, лихорадки Ку, гранулоцитарного анаплазмоза, РНК возбудителей клещевого энцефалита, моноцитарного эрлихиоза, боррелиоза. В 26 пробах органов мелких

млекопитающих обнаружена 16S рРНК патогенных лептоспир. В шести пробах эктопаразитов (клещей) обнаружена ДНК риккетсий группы пятнистых лихорадок, в одной пробе – РНК боррелий.

В последующем вследствие ограничений для въезда в ряд провинций Вьетнама в связи с пандемией COVID-19 и необходимостью задействования лаборатории в диагностике SARS-CoV-2 для исследования материала, собранного при проведении эпизоотологического обследования в северных провинциях Вьетнама, МЛМД базировалась на территории Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра. Полученный зоологической группой материал доставляли в сосуде Дьюара в течение 2–5 дней в г. Ханой и исследовали в мобильной лаборатории.

В общей сложности за период 2019–2021 гг. проведено 5800 проб зоологического материала (пробы органов мелких млекопитающих, эктопаразитов) сотрудниками Российского противочумного института «Микроб» и Тропического центра. Выполнено более 15 тыс. исследований различными методами.

Таким образом, задействование МЛМД при проведении эпизоотологического обследования позволило оперативно получить сведения о наличии циркуляции ряда возбудителей на территории северных провинций Вьетнама и обеспечило соблюдение требований биологической безопасности при проведении исследований в полевых условиях. Использование МЛМД в экспедиционной работе способствовало приближению современных диагностических технологий непосредственно к природным очагам инфекционных болезней.

Применение МЛМД для диагностики возбудителя новой коронавирусной инфекции. Первый случай новой коронавирусной инфекции во Вьетнаме зарегистрирован 23 января 2020 г. За период с января 2020 по апрель 2021 г. на протяжении первых трех волн пандемии в мире Вьетнаму удалось контролировать распространение COVID-19. Профилактические мероприятия по борьбе с коронавирусной инфекцией во Вьетнаме основаны на пяти принципах: профилактика, выявление больных, изоляция, зонирование, лечение. Большое значение в профилактике новой коронавирусной инфекции сыграло проведение дезинфекционных мероприятий в общественных местах и очагах заболевания, повсеместное ношение медицинских масок, введение мер по дистанцированию населения и изоляции больных, контактных и приезжих, классифицирование по группам риска населенных пунктов и территорий, перепрофилирование медицинских учреждений. Всего на территории Вьетнама за вышеуказанный период зарегистрировано около 3 тыс. случаев COVID-19 и 35 летальных случаев, что позволило международному сообществу высоко оценить результаты борьбы с эпидемией COVID-19 во Вьетнаме.

Однако в ряде регионов складывалась неблагоприятная эпидемиологическая обстановка и отсут-

ствовала возможность проведения тестирования населения в необходимом объеме, в то время как одной из первостепенных задач в комплексе противоэпидемических мероприятий является экстренное выявление больных COVID-19 и контактных лиц. С целью обеспечения необходимых объемов лабораторной диагностики нового коронавируса 1 августа 2020 г. МЛМД и группа специалистов Тропического центра в составе четырех эпидемиологов и специалистов по лабораторной диагностике и двух водителей направлена в провинцию Куангнам. Мобильная лаборатория дислоцировалась на военной базе г. Дананг. Бригада была оснащена линейкой оборудования для ПЦР-исследований с детекцией результатов в режиме реального времени, диагностическими наборами, расходными материалами, средствами индивидуальной защиты, дезинфектантами в полном объеме [11]. За полтора месяца работы проведено тестирование 13717 проб клинического материала, полученных из Центра по контролю и профилактике заболеваний г. Дананг, провинции Куангнам, военного госпиталя, военно-профилактической медицинской бригады. Выявлено 6 положительных образцов.

В мае 2021 г. Вьетнам столкнулся с новой волной COVID-19, эпидемия коронавирусной инфекции распространилась на многие провинции и города Вьетнама. По запросу Центра по контролю и профилактике заболеваний провинции Бакзянг Тропическим центром в г. Бакзянг направлена МЛМД и группа специалистов в составе семи человек. С 16 мая по 20 июня 2021 г. на базе МЛМД организовано исследование клинического материала, полученного из Центра по контролю и профилактике заболеваний г. Бакзянг. В общей сложности проведено исследование 20567 объединенных проб от 53506 человек методом ПЦР, выявлено 278 положительных образцов.

После завершения работы в провинции Бакзянг МЛМД передислоцирована в г. Хошимин, который на тот период являлся крупнейшим эпидемическим очагом страны. Вместе с мобильной лабораторией в Хошимин направлено пять специалистов и два водителя Тропического центра. С 4 июля по 4 августа протестирована 18831 объединенная проба от 132651 человека, полученная из Центра по контролю и профилактике заболеваний г. Хошимин и от сотрудников Южного отделения Вьетнамско-Российского Тропического центра. Выявлено 2707 положительных образцов. Помимо проведения лабораторных исследований клинического материала, специалистами Тропического центра оказана консультативно-методическая помощь и проведено обучение сотрудников Южного отделения Вьетнамско-Российского Тропического центра методам лабораторной диагностики COVID-19.

С 4 августа по 9 ноября 2021 г. группа специалистов Тропического центра осуществляли исследования на базе МЛМД в провинции Биньзюнг, г. Танюйен, где на тот момент отмечалось ухудше-

ние эпидемиологической ситуации по новой коронавирусной инфекции. Образцы для исследования получены из Центра по контролю и профилактике заболеваний провинции Биньзюнг, медицинского центра и военного командования г. Танюйен. За три месяца непрерывной работы проведено исследование 48361 объединенного образца клинического материала от 215761 человека. ПНК SARS-CoV-2 выявлена в 19129 пробах.

За период с марта 2020 по февраль 2021 г. МЛМД задействована для проведения диагностики новой коронавирусной инфекции в четырех провинциях Вьетнама: Дананг, Бакзянг, Хошимин и Биньзюнг. В общей сложности за время работы проведено исследование 101476 образцов, полученных от 415635 человек, выявлено 22120 положительных проб.

Усиление стационарных лабораторных баз МЛМД в различных провинциях Вьетнама и ее размещение в отдаленных труднодоступных районах способствовало наращиванию диагностических мощностей лабораторий учреждений здравоохранения СРВ и повышению качества исследований в условиях соблюдения требований биологической безопасности, что явилось неотъемлемой и эффективной составляющей противодействия новой коронавирусной инфекции.

Опыт задействования МЛМД во Вьетнаме при проведении эпизоотологического обследования природных очагов опасных инфекционных болезней позволил усовершенствовать технологию мониторинга природно-очаговых инфекций, тем самым увеличить исследовательский потенциал Тропического центра. Использование лаборатории в борьбе с эпидемией COVID-19 повысило готовность страны к возникновению ЧС санитарно-эпидемиологического характера и усилило эффективность мер реагирования. Увеличение количества мобильных лабораторий во Вьетнаме может стать одним из ключевых элементов укрепления общего потенциала системы реагирования на угрозы биологического характера в Социалистической Республике Вьетнам.

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

Список литературы

1. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Специализированные противоэпидемические бригады Роспотребнадзора: роль в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения на современном этапе. Саратов: Амирит; 2019. 200 с.
2. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Карнаухов И.Г., Морозов К.М., Казакова Е.С., Шарова И.Н., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Новый этап в эволюции специализированных противоэпидемических бригад Роспотребнадзора – создание модернизированного мобильного комплекса СПЭБ второго поколения. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 5:210.
3. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Ликвидация эпидемии Эбола в Гвинейской Республике: опыт работы специализированной противоэпидемической бригады Роспотребнадзора. М.: Творческий информационно-издательский центр; 2016. 354 с.

4. Попова А.Ю., редактор. COVID-19: научно-практические аспекты борьбы с пандемией в Российской Федерации. Саратов: Амрит; 2021. 608 с.

5. Шарова И.Н., Красовская Т.Ю., Казорина Е.В., Казанцев А.В., Проскурякова М.В., Куклев В.Е., Щербакова С.А., Кутырев В.В., Адилов Р.И., Булычева Е.В., Троицкая А.А., Агапов Б.Л., Акимов И.С., Балган О.Л., Чумакова Н.А., Ткаченко В.А., Глушков Э.А., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Мищенко А.И., Мухтургин Г.Б. Опыт и перспективы использования мобильных лабораторий при проведении эпидемиологического надзора за чумой, другими особо опасными, природно-очаговыми, зоонозными инфекционными болезнями. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 4:26–33. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-26-33.

6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. XXVII Всемирная летняя Универсиада 2013 года в Казани. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. Тверь: Триада; 2013. 528 с.

7. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., редакторы. XXII Олимпийские зимние игры и XI Паралимпийские зимние игры 2014 года в г. Сочи. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. Тверь: Триада; 2015. 575 с.

8. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Чемпионат мира по футболу 2018 года в России: обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. Н. Новгород: Исток; 2019. 448 с.

9. Поршаков А.М., Чумачкова Е.А., Касьян Ж.А., Оглодин Е.Г., Мо Л., Кыонг В., Тоан Ч., Нга Б. Результаты эпизоотологического обследования на чуму и другие зоонозы в северных провинциях Социалистической Республики Вьетнам весной 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:133–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-133-138.

10. Попова А.Ю., Топорков А.В., редакторы. Актуальные направления и перспективы российско-вьетнамского сотрудничества в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия: коллективная монография. Волгоград: Волга-Пресс; 2019. 400 с.

11. Bui T.T. Nga, Pham T.H. Giang, Trinh V. Toan, Dang T.V. Huong, Duong V. Nghia, Bui T. Lan Anh. Verification of SARS-CoV-2 virus detection procedure. *J. Trop. Science Technology*. 2020; 21.

References

1. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Specialized Anti-Epidemic Teams of the Rospotrebnadzor: the Role in Ensuring the Sanitary and Epidemiological Welfare of the Population at the Present Stage]. Saratov; 2019. 200 p.

2. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Karnaukhov I.G., Morozov K.M., Kazakova E.S., Sharova I.N., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. [A new stage in the evolution of specialized anti-epidemic teams of Rospotrebnadzor is the creation of a modernized second-generation SAET mobile complex]. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2017; (Suppl.):210.

3. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Elimination of the Ebola Epidemic in the Republic of Guinea: Operational Experience of the Specialized Anti-Epidemic Team of the Rospotrebnadzor]. Moscow; 2016. 354 p.

4. Popova A.Yu., editors. [COVID-19: Scientific and Practical Aspects of the Fight against the Pandemic in the Russian Federation]. Saratov; 2021. 608 p.

5. Sharova I.N., Krasovskaya T.Yu., Kazorina E.V., Kazantsev A.V., Proskuryakova M.V., Kuklev V.E., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V., Adilov R.I., Bulychева E.V., Troitskaya A.A., Agapov B.L., Akimova I.S., Balgan O.L., Chumakova N.A., Tkachenko V.A., Glushkov E.A., Rozhdetsvensky E.N., Bazarova G.Kh., Mishchenko A.I., Mukhturgin G.B. [Experience and prospects for the use of mobile laboratories in carrying out epidemiological surveillance of plague and other especially dangerous, natural focal, zoonotic infectious diseases]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (4):26–33. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-26-33.

6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [XXVII World Summer Universiade 2013 in Kazan. Ensuring Sanitary and Epidemiological Well-Being]. Tver; 2013. 528 p.

7. Onishchenko G.G., Kulichenko A.N., editors. [XXII Olympic Winter Games and XI Paralympic Winter Games 2014 in Sochi. Ensuring Sanitary and Epidemiological Well-Being]. Tver: Triada Publishing House LLC; 2015. 575 p.

8. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [The 2018 FIFA World Cup in Russia: Ensuring Sanitary and Epidemiological Well-Being]. N. Novgorod; 2019. 448 p.

9. Porshakov A.M., Chumachkova E.A., Kasyan Zh.A., Oglodin E.G., Mo L., Kyong V., Toan Ch., Nga B. [Results of epidemiological examination for plague and other zoonoses in northern provinces of the Socialist Republic of Vietnam in the spring of 2019]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):133–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-133-138.

10. Popova A.Yu., Toporkov A.V., editors. [Actual Directions and Prospects of Russian-Vietnamese Cooperation in the Field of Ensuring Sanitary and Epidemiological Well-Being: a collective monograph]. Volgograd; 2019. 400 p.

11. Bui T.T. Nga, Pham T.H. Giang, Trinh V. Toan, Dang T.V. Huong, Duong V. Nghia, Bui T. Lan Anh. Verification of SARS-CoV-2 virus detection procedure. *J. Trop. Science Technology*. 2020; 21.

Authors:

Kas'yan Zh.A., Sharova I.N., Oglodin E.G., Golubev S.N., Proskuryakova M.V., Lyapin M.N., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Le Thi Lan Anh, Vo Viet Cuong, Trinh Van Toan, Bui Thi Lan Anh, Hoang Duc Hau, Dang Thi Viet Huong, Pham Thi Ha Giang, Duong Van Nghia, Bui Thi Thanh Nga. Joint Vietnam-Russia Tropical Science and Technology Research Center. Hanoi, Vietnam.

Об авторах:

Касьян Ж.А., Шарова И.Н., Оглодин Е.Г., Голубев С.Н., Проскурякова М.В., Ляпин М.Н., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Le Thi Lan Anh, Vo Viet Cuong, Trinh Van Toan, Bui Thi Lan Anh, Hoang Duc Hau, Dang Thi Viet Huong, Pham Thi Ha Giang, Duong Van Nghia, Bui Thi Thanh Nga. Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр. Социалистическая Республика Вьетнам, Ханой.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-95-106

УДК 614.4+614.8

В.В. Кутырев¹, С.А. Щербакова¹, И.Г. Карнаухов¹, Ж.А. Касьян¹, А.Е. Шиянова², В.А. Горбунов³,
А.Г. Красько³, А.Л. Лешкевич⁴, Е.В. Федорович⁴, П.А. Семижон³, Л.М. Рустамова³, А.С. Петкевич³,
Т.К. Ерубайев⁵, Т.З. Аязбаев⁵, Д.А. Турегелдиева⁵, Г.Г. Ковалева⁵, С.К. Бердиев⁶, Н.Т. Усенбаев⁶,
Ж.С. Казыбаева⁶

Система мониторинга и реагирования на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера в странах СНГ

¹ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;
²ФКУЗ «Противочумный центр», Москва, Российская Федерация; ³ГУ «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь; ⁴ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь; ⁵РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций
имени М. Айкимбаева», Алма-Ата, Республика Казахстан; ⁶Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций,
Бишкек, Кыргызская Республика

Важнейшей составляющей укрепления потенциала реагирования на биологические угрозы как на национальном, так и на межгосударственном уровне является формирование на пространстве СНГ единой системы мониторинга и реагирования на чрезвычайные ситуации (ЧС) санитарно-эпидемиологического характера. Цель работы – обзор систем мониторинга и реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера в странах СНГ на примере Российской Федерации, Республики Беларусь, Республики Казахстан и Кыргызской Республики, характеристика основных направлений международного сотрудничества по вопросам противодействия угрозам биологического характера и координации международных ответных мер в странах СНГ. **Материалы и методы.** Использованы информационно-аналитические материалы, предоставленные организациями, ответственными за эпидемиологический надзор и контроль в странах СНГ, источники сети Интернет, публикации. **Результаты и обсуждение.** Организация и функционирование систем мониторинга и реагирования на ЧС в странах СНГ является государственной функцией, включает, как правило, национальный, региональный (субнациональный) и территориальный (местный) уровни, имеющие горизонтальные и вертикальные связи. Юридическую основу составляют документы законодательного уровня. Межведомственное взаимодействие при реагировании на ЧС осуществляется как на республиканском уровне, так и на административных территориях, основой взаимодействия являются комплексное планирование профилактических и противоэпидемиологических мероприятий и функционирование на постоянной основе соответствующих организационных структур. При поддержке Правительства Российской Федерации с 2015 г. реализуются программы, направленные на оказание содействия странам-партнерам в вопросах внедрения и реализации Международных медико-санитарных правил (2005 г.) с целью повышения национального потенциала реагирования и формирования единой системы реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера на пространстве СНГ. Основными направлениями взаимодействия являются укрепление материально-технической базы профильных учреждений и кадрового ресурса, научное сотрудничество. В результате реализации программ сотрудничества на сегодняшний день в странах СНГ фактически сформирована единая система мониторинга и оперативного реагирования на ЧС в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера, объединяющая более 15 профильных учреждений 8 стран СНГ.

Ключевые слова: обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия, чрезвычайная ситуация, эпидемиологический надзор, санитарная охрана территории.

Корреспондирующий автор: Карнаухов Игорь Геннадиевич, e-mail: rusrap@microbe.ru.

Для цитирования: Кутырев В.В., Щербакова С.А., Карнаухов И.Г., Касьян Ж.А., Шиянова А.Е., Горбунов В.А., Красько А.Г., Лешкевич А.Л., Федорович Е.В., Семижон П.А., Рустамова Л.М., Петкевич А.С., Ерубайев Т.К., Аязбаев Т.З., Турегелдиева Д.А., Ковалева Г.Г., Бердиев С.К., Усенбаев Н.Т., Казыбаева Ж.С. Система мониторинга и реагирования на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера в странах СНГ. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:95–106. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-95-106

Поступила 07.07.2022. Принята к публ. 03.08.2022.

V.V. Kutyrev¹, S.A. Shcherbakova¹, I.G. Karnaukhov¹, Zh.A. Kas'yan¹, A.E. Shiyanova²,
V.A. Gorbunov³, A.G. Kras'ko³, A.L. Leshkevich⁴, E.V. Fedorovich⁴, P.A. Semizhon³,
L.M. Rustamova³, A.S. Petkevich³, T.K. Erubayev⁵, T.Z. Ayazbaev⁵, D.A. Turegeldieva⁵,
G.G. Kovaleva⁵, S.K. Berdiev⁶, N.T. Usenbaev⁶, Zh.S. Kazybaeva⁶

System of Monitoring and Response to Public Health Emergencies of Sanitary-Epidemiological Character in the CIS Countries

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

²Plague Control Center, Moscow, Russian Federation;

³Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus;

⁴Republican Center of Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus;

⁵National Scientific Center for Particularly Dangerous Infections named after M. Aikimbaev, Alma-Ata, Republic of Kazakhstan;

⁶Republican Center for Quarantine and Particularly Dangerous Infections, Bishkek, Kyrgyz Republic

Abstract. The most important component of strengthening the potential for responding to biological threats both at the national and interstate levels is the formation of a unified system for monitoring and responding to emergencies (ES) of sanitary-epidemiological nature in the CIS territory. **The aim** of the work was to review the systems for monitoring and responding to emergencies of sanitary-epidemiological character in the CIS countries by the example of the Russian Federation, the Republic of Belarus, the Republic of Kazakhstan and the Kyrgyz Republic, to characterize the main areas of international cooperation on countering biological threats and coordinating international response measures in the CIS countries. **Materials and methods.** Information and analytical materials provided by organizations responsible for epidemiological surveillance and control in the CIS countries, Internet sources, and publications were used for the study. **Results and discussion.** The organization and functioning of the systems for monitoring and responding to emergencies in the CIS countries is a state function. It includes, as a rule, the national, regional (sub-national) and territorial (local) levels, which have horizontal and vertical connections. The legal framework is made up of documents of the legislative level. Interdepartmental interaction in response to emergencies is carried out both at the republican level and in administrative territories; the basis for interaction is the integrated planning of preventive and anti-epidemic measures and the functioning of the relevant organizational structures on an ongoing basis. Since 2015, with the support of the Government of the Russian Federation, programs have been implemented aimed at assisting partner countries in the implementation of the International Health Regulations (2005) in order to increase national response capacity and form a unified sanitary-epidemiological emergency response system in the CIS countries. The main areas of collaboration are strengthening the material and technical base and human resources of specialized institutions and scientific cooperation. As a result of the program implementation, a unified system for monitoring and prompt response to emergencies in the field of public health of sanitary-epidemiological nature has essentially been formed in the CIS countries to date, uniting more than 15 specialized institutions from 8 CIS countries.

Key words: provision of sanitary-epidemiological welfare, emergency situation, epidemiological surveillance, sanitary protection of the territory.

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

Corresponding author: Igor G. Karnaukhov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kutyrev V.V., Shcherbakova S.A., Karnaukhov I.G., Kas'yan Zh.A., Shiyanova A.E., Gorbunov V.A., Kras'ko A.G., Leshkevich A.L., Fedorovich E.V., Semizhon P.A., Rustamova L.M., Petkevich A.S., Erubaev T.K., Ayazbaev T.Z., Turegeldieva D.A., Kovaleva G.G., Berdiev S.K., Usenbaev N.T., Kazybaeva Zh.S. System of Monitoring and Response to Public Health Emergencies of Sanitary-Epidemiological Character in the CIS Countries. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:95–106. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-95-106

Received 07.07.2022. Accepted 03.08.2022.

Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>
Shcherbakova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>
Karnaukhov I.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8181-6727>
Kas'yan Zh.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9828-3277>

Erubaev T.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5291-3571>
Turegeldieva D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4366-6748>
Kovaleva G.G., ORCID: <https://orcid.org/0002-2673-2213>

Начало XXI в. ознаменовано появлением в различных частях земного шара ряда ранее неизвестных инфекционных болезней, имеющих серьезные социально-экономические последствия, а в ряде случаев повлекших за собой возникновение чрезвычайных ситуаций (ЧС) санитарно-эпидемиологического характера. Вследствие постоянного возникновения новых угроз биологической безопасности укрепление систем эпидемиологического надзора и реагирования занимает центральное место в деятельности по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения как в каждой отдельно взятой стране, так и в мировом масштабе. Обеспечение биологической безопасности и санитарно-эпидемиологического благополучия населения невозможно без развития международного сотрудничества в области предупреждения и реагирования на ЧС биологического характера как на двухсторонней основе, так и в рамках межгосударственных объединений.

Регион СНГ характеризуется наличием исторически сложившихся тесных культурных и экономических связей. Одним из факторов, обуславливающих интенсивное взаимодействие стран в различных областях деятельности, является значительная протяженность совместных государственных границ. Доля смежных границ Беларуси, Казахстана, Кыргызстана и России в среднем составляет 59,3 %

от общей протяженности их государственных границ, варьируя от 35 до 83 %.

Наличие трансграничных природных очагов особо опасных инфекционных болезней, расширение ареала природно-очаговых инфекций, возникновение микроорганизмов, устойчивых к противомикробным препаратам наряду с интенсивными миграционными связями обуславливают потенциал возникновения и развития региональных и трансграничных ЧС и диктуют необходимость выработки в рамках развития сотрудничества стран СНГ совместной стратегии реагирования на биологические угрозы на региональном и национальном уровнях, своевременного обмена информацией, совместного использования технологических ресурсов, экстренной мобилизации ресурсов на межгосударственном уровне.

Учитывая накопленный опыт Российской Федерации по реагированию на ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения с помощью специализированных противочумных бригад (СПЧБ) Роспотребнадзора, весьма актуальным на сегодняшний день является его использование и распространение на пространстве СНГ. Существует необходимость формирования единых методических подходов и алгоритмов реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического

характера в рамках реализации Международных медико-санитарных правил (ММСП) (2005 г.) с целью содействия оперативному реагированию на ЧС как на национальном, так и на межгосударственном уровне.

Цель работы – рассмотрение систем мониторинга и реагирования на ЧС в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера в странах СНГ на примере Российской Федерации, Республики Беларусь, Республики Казахстан и Кыргызской Республики, характеристика основных направлений международного сотрудничества по вопросам противодействия угрозам биологического характера и координации международных ответных мер на пространстве СНГ.

Материалы и методы

В статье использованы информационно-аналитические материалы, предоставленные организациями, ответственными за вопросы эпидемиологического надзора и контроля в странах СНГ. Дополнительный справочный материал получен из источников сети Интернет, официальных данных ВОЗ по результатам проведенной внешней оценки [1, 2], материалов научных публикаций.

Результаты и обсуждение

Прототипом национальных систем реагирования на ЧС в странах СНГ является санитарно-эпидемиологическая служба СССР. Однако за последние 15 лет в большинстве стран СНГ произошло значительное реформирование структур, ответственных за обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения, с дополнением их функций.

Российская Федерация. Современная структура государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации создана путем слияния органов и учреждений Госсанэпиднадзора, частично Министерства путей сообщения РФ, Госторгинспекции, Государственного комитета по антимонопольной политике. Созданному в 2004 г. органу – Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – передана часть функций других министерств, постановлениями Правительства РФ закреплены обновленные функции и полномочия.

Законодательство в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения основано на Конституции РФ и состоит из Федерального закона от 30.03.1999 № 52-ФЗ (ред. от 13.07.2020) «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», других федеральных законов и принимаемых в соответствии с ними нормативно-правовых актов Российской Федерации.

Основными направлениями противодействия глобальным угрозам в России являются: внедрение

нового инструментария (геоинформационных и автоматизированных информационных систем) в эпидемиологический надзор, в том числе для оценки динамики и прогнозирования внешних и внутренних угроз; укрепление лабораторной базы и внедрение новых диагностических технологий; совершенствование и повышение эффективности профилактических мероприятий; разработка новых средств профилактики и диагностики; укрепление кадрового потенциала; развитие международного сотрудничества в отношении эпидемиологического надзора и контроля широкого спектра угроз биологического характера.

На всех административных территориях РФ обеспечено функционирование санитарно-противоэпидемических комиссий, которые осуществляют контроль за своевременным и полным проведением противоэпидемических мероприятий по локализации и ликвидации очагов инфекционных заболеваний, обеспечивают межведомственное взаимодействие, а также разработку и реализацию Комплексных планов по санитарной охране территории РФ, утверждаемых органами исполнительной власти территорий (на уровне правительств субъектов Российской Федерации) и предусматривающих готовность различных ведомств к возникновению ЧС, проведению профилактических и противоэпидемических мероприятий [3].

Установление рисков возникновения ЧС в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации обуславливает исполнение государственной функции по осуществлению санитарно-карантинного контроля более чем в 200 пунктах пропуска (Положение о порядке осуществления государственного санитарно-эпидемиологического надзора (контроля) за лицами и транспортными средствами, пересекающими таможенную границу Евразийского экономического союза, подконтрольной продукцией (товарами), перемещаемой через таможенную границу Евразийского экономического союза), и проведение мероприятий по санитарной охране на всей таможенной территории Евразийского экономического союза (утверждено решением Комиссии Таможенного союза от 28.05.2010 № 299 (изменения внесены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 16.02.2018 № 5); приказом Роспотребнадзора от 17.07.2012 № 767 «Об утверждении Административного регламента исполнения Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека государственной функции по осуществлению санитарно-карантинного контроля в пунктах пропуска на российском участке внешней границы Таможенного союза»).

Проводится автоматизация функционирования связанных между собой процедур и функций в рамках организационной структуры Роспотребнадзора. Осуществляется внедрение технологий Единой информационно-аналитической системы

Роспотребнадзора в деятельность подведомственных территориальных органов и учреждений. Система состоит из таких ключевых модулей, как «Лабораторное обеспечение», «Контрольно-надзорная деятельность», «Эпидемиологический надзор и мониторинг», в которые будет поступать, храниться и оперативно анализироваться информация, в том числе о санитарно-эпидемиологической ситуации в стране и различных регионах и научных исследованиях. Разработана и внедряется на всех санитарно-карантинных пунктах автоматизированная информационная система «Периметр», которая в автоматизированном режиме собирает и систематизирует информацию об эпидемиологическом неблагополучии в странах мира для информирования специалистов Роспотребнадзора о каждом пассажирском рейсе и позволяет перевести документооборот на электронную основу, что повышает оперативность мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации от завоза опасных инфекционных болезней.

Создаются детальные многослойные электронные паспорта природно-очаговых инфекционных болезней на территории Российской Федерации с целью формирования единого ГИС-портала для проведения пространственного анализа и выработки эффективных управленческих решений для снижения риска инфицирования и сохранения здоровья населения.

Лабораторная диагностика инфекционных болезней на территории РФ обеспечена в соответствии с приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации». Организационная структура лабораторной базы Роспотребнадзора представлена следующим образом:

- центры гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации и их филиалы;
- центры индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противозидемической готовности (19 противочумных учреждений);
- опорные базы центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности (21 опорная база ФБУЗ «ЦГиЭ»);
- научно-методические центры по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности (10);
- референс-центры по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней (54) на базе 21 учреждения (17 научно-исследовательских институтов Роспотребнадзора, 1 научно-исследовательская организация (НИО) Минобороны России, 1 НИО Российской академии наук, 2 НИО Минздрава России);
- национальные центры верификации диагностической деятельности, выполняющие функции

Государственных коллекций (Российский противочумный институт «Микроб», ГНЦ ВБ «Вектор», ГНЦ ПМБ).

Ключевым звеном созданной в Российской Федерации системы предупреждения, выявления и противодействия биологическим угрозам, включающей силы и средства оперативного реагирования, являются СПЭБ Роспотребнадзора. СПЭБ организованы на базе пяти противочумных институтов Роспотребнадзора и являются внештатными мобильными формированиями оперативного реагирования, имеющими высококвалифицированный кадровый состав, способными решать задачи по предупреждению и ликвидации угроз биологической безопасности, оснащенными мобильными лабораториями, которые позволяют проводить индикацию и идентификацию ПБА I–IV групп патогенности. СПЭБ Роспотребнадзора были задействованы в борьбе с эпидемическими проявлениями особо опасных инфекционных болезней (чумы, холеры, сибирской язвы, лихорадки Эбола) как на территории РФ, так и за ее пределами [4, 5], в предупреждении и ликвидации эпидемических последствий стихийных бедствий (землетрясений, наводнений), в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия в зонах гуманитарных и техногенных катастроф, в ходе проведения массовых мероприятий с международным участием [6].

В 2021 г. с целью повышения эффективности профилактических мероприятий, недопущения завоза опасных инфекций на территорию Российской Федерации и защиты страны от эпидемиологических угроз, по поручению Правительства РФ Роспотребнадзором разработана стратегия «Санитарный щит». В основе стратегии лежат четыре взаимосвязанные составляющие: эффективное предупреждение, быстрое выявление, оперативное реагирование на угрозы здоровья населения и обеспечение безопасной среды обитания. «Санитарный щит» включает в себя несколько направлений: «Защита от угроз безопасности здоровью 24/7», «Лабораторная инфраструктура XXI века», «Тест-системы для выявления новых инфекционных болезней за 4 дня, вакцины – за 4 месяца», «Новая модель санитарно-эпидемиологического поведения» – и позволяет развить глубоко эшелонированную трехуровневую систему ответных мер на современные угрозы и вызовы, включающую национальный уровень, ближний периметр евразийского пространства и далее зарубежье.

Республика Беларусь. Система органов и учреждений Министерства здравоохранения Республики Беларусь, осуществляющих государственный санитарный надзор, утвержденная в соответствии с Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 10.04.2001 № 495 «О Государственной системе предупреждения и ликвидации чрезвычайных ситуаций» (ред. от 12.01.2017 № 22), а также межведомственное взаимодействие в ответ на ЧС представлены на рис. 1.



Рис. 1. Система взаимодействия органов и учреждений в ответ на ЧС в области общественного здравоохранения в Республике Беларусь

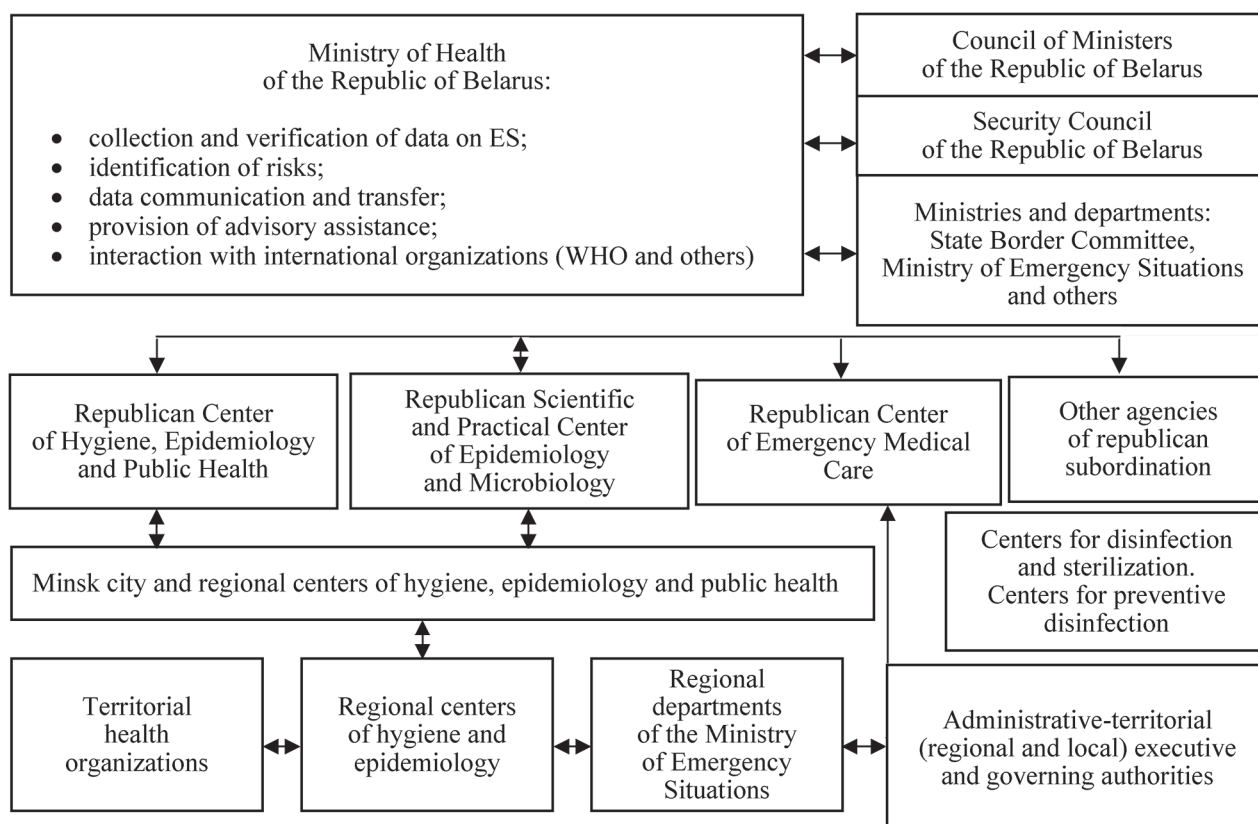


Fig. 1. The system of interaction between bodies and institutions in response to emergency situations in the sphere of public health in the Republic of Belarus

Правовой основой обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения является Закон Республики Беларусь от 07.01.2012 № 340-З «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения». Выполнение основных задач по реализации ММСП в Республике Беларусь обеспечивается государственной системой предупреждения и ликвидации ЧС. Положение, структура и основные направления деятельности всех участников этой системы утверждены Постановлением Совета Министров Республики Беларусь (2001 г.) [7].

Министерством здравоохранения созданы специализированные формирования службы экстренной медицинской помощи и специализированные формирования государственного санитарного надзора, являющиеся нештатными формированиями быстрого реагирования: 6 санитарно-эпидемиологических отрядов, 9 специализированных санитарно-противоэпидемических бригад республиканского подчинения, 149 групп санитарно-эпидемиологической разведки на базе органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор областного, зонального и районного уровней. На базе 30 региональных центров гигиены и эпидемиологии созданы головные лаборатории сети наблюдения и лабораторного контроля. Аккредитованные лаборатории, работающие по программе забора проб и индикации микроорганизмов I–II групп патогенности, функционируют на базе всех областных центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья и Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья.

Научно-методическое обеспечение деятельности системы мониторинга и предупреждения ЧС осуществляется Республиканским научно-практическим центром эпидемиологии и микробиологии. Центр участвует в семи международных программах по контролю инфекционных заболеваний; является национальным контактным органом Конвенции о запрещении производства, хранения бактериологического (биологического) и токсинного оружия и основным исполнителем дорожной карты по реализации в стране Резолюции 1540 Совета Безопасности ООН в части биологической безопасности; имеет лаборатории, соответствующие классу биологической безопасности уровня BSL3.

На государственной границе функционирует 36 пунктов пропуска, оборудованных в соответствии с требованиями нормативных правовых актов республики и документами ЕАЭС. Санитарный контроль физических лиц и транспортных средств проводится совместно сотрудниками пограничной службы и специалистами санитарно-карантинных пунктов.

Республика Казахстан. В соответствии с Кодексом «О здоровье народа и системе здравоохранения Республики Казахстан» (2009 г.) в государственное регулирование входит санитарно-эпидемиологический мониторинг состояния здоровья населения и среды обитания; проведение

санитарно-противоэпидемических и санитарно-профилактических мероприятий в отношении больных инфекционными и паразитарными заболеваниями; осуществление санитарной охраны территории Республики Казахстан (РК); введение ограничительных мероприятий, в том числе карантина; проведение медицинских осмотров, профилактических прививок и гигиенического обучения для лиц декретированной группы населения. Все случаи инфекционных, паразитарных, профессиональных заболеваний и отравлений населения подлежат регистрации и расследованию государственными органами в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Действующая в республике система мониторинга и реагирования при опасных инфекционных заболеваниях и чрезвычайных ситуациях биологического характера направлена на раннее выявление, предотвращение распространения и ликвидацию ЧС. Профилактика и контроль за инфекционными болезнями, вызываемыми возбудителями I–IV групп патогенности, входит в задачи Комитета санитарно-эпидемиологического контроля Министерства здравоохранения Республики Казахстан (КСЭК МЗ РК). Мониторинг эпидемиологической ситуации проводится территориальными департаментами КСЭК МЗ РК совместно с лабораторной сетью Национального центра экспертизы (НЦЭ), в ряде регионов – с использованием автолабораторий.

Научно-практический центр санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга (НПЦСЭЭМ), являющийся филиалом Национального центра общественного здравоохранения, обеспечивает механизм подтверждения/идентификации лабораторных результатов на базе референтных лабораторий и регулирует поток информации от местного до республиканского уровня. С 2010 г. идет внедрение электронной интегрированной системы надзора за заболеваниями на базе отделов особо опасных инфекций НЦЭ [8]. В случае регистрации зоонозного инфекционного заболевания среди населения информация предоставляется в Комитет ветеринарного контроля и надзора Министерства сельского хозяйства (МСХ) РК, обеспечивая межведомственное взаимодействие при проведении противоэпидемических мероприятий.

РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева» (ННЦООИ) Министерства здравоохранения РК является Референтным центром по эпидемиологическому, эпизоотологическому и лабораторному мониторингу чумы и холеры в РК и обеспечивает координацию работы противочумной службы РК, включающей 9 противочумных станций, оказание консультативно-методической помощи, подготовку специализированных кадров, производит диагностические и профилактические препараты. Внедрена ГИС-технология в мониторинг ООИ с паспортизацией, электронной интегрированной системой по

надзору за заболеваниями для последующего прогнозирования. Для оперативного реагирования на вспышки особо опасных инфекций на базе ННЦООИ сформирована специализированная противоэпидемическая бригада. В 2017 г. при ННЦООИ введена в эксплуатацию Центральная Референс-лаборатория (ЦРЛ), построенная по международным стандартам BSL-2/BSL-3/ABSL-3 в рамках межправительственного соглашения между РК и США. Основной целью ЦРЛ является консолидация и безопасное хранение опасных биологических патогенов, международное сотрудничество, подготовка персонала по биобезопасности/биозащите и выполнение арбитражных исследований на национальном и международном уровнях. ННЦООИ является основным оператором

по подготовке кадров по лабораторной биобезопасности и биозащите и регулярно проводит оценку лабораторной службы РК по вопросам биобезопасности [9].

Санитарно-карантинный контроль в пропускных пунктах проводится территориальными подразделениями санитарно-эпидемиологической службы, включает контроль за пассажирами, экипажами, поездными бригадами, транспортными средствами, грузами на авто-, ж/д- и авиамагистральных и является основной частью санитарной охраны территории РК. В случае выявления больного с подозрением на опасное инфекционное (паразитарное) заболевание специалистами санитарно-карантинного пункта в соответствии с оперативным планом принятия от-

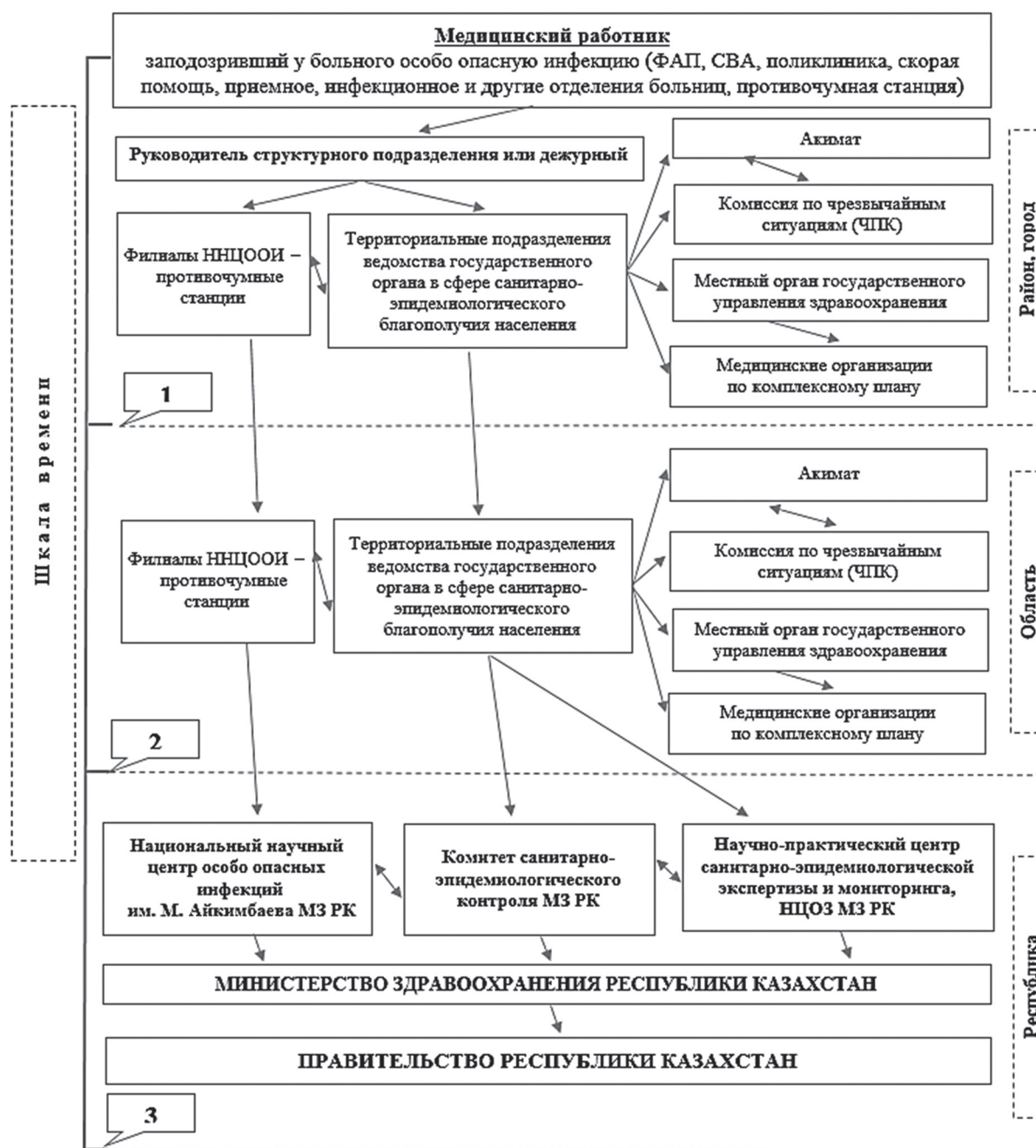


Рис. 2. Схема экстренного оповещения при подозрении на особо опасные инфекции в Республике Казахстан

ветных мер проводятся оповещение, санитарно-противоэпидемические и профилактические мероприятия по изоляции больного, его госпитализации в организацию здравоохранения, установлению контактных лиц и их обсервации, организации дезинфекционных мероприятий в отношении транспортного средства. Схема оповещения при ситуациях, когда вводится алгоритм действий оперативного реагирования, включает информирование территориального управления здравоохранения (далее – МЗ РК), территориального департамента КСЭК и НЦЭ (далее – Комитета санитарно-эпидемиологического контроля МЗ РК), территориальной инспекции комитета ветеринарного надзора МСХ (в случае зоонозного инфекционного заболевания). Первая информация из медицинской организации

передается в течение 3 часов с момента выявления больного (рис. 2).

В случае угрозы ввоза и/или распространения опасной инфекционной болезни на соответствующей территории вводятся ограничительные мероприятия, в том числе карантин, и организуется межведомственная государственная комиссия по предупреждению и ликвидации ЧС. Штаб ЧС выполняет оперативное руководство по координации деятельности центральных и местных исполнительных органов, организует лабораторную работу на базе подразделений НЦЭ и ННЦООИ и комплекс санитарно-противоэпидемических мероприятий. Кроме того, штаб ЧС решает важные вопросы материально-технического снабжения, в том числе обеспечения лабораторной службы необходимыми материалами

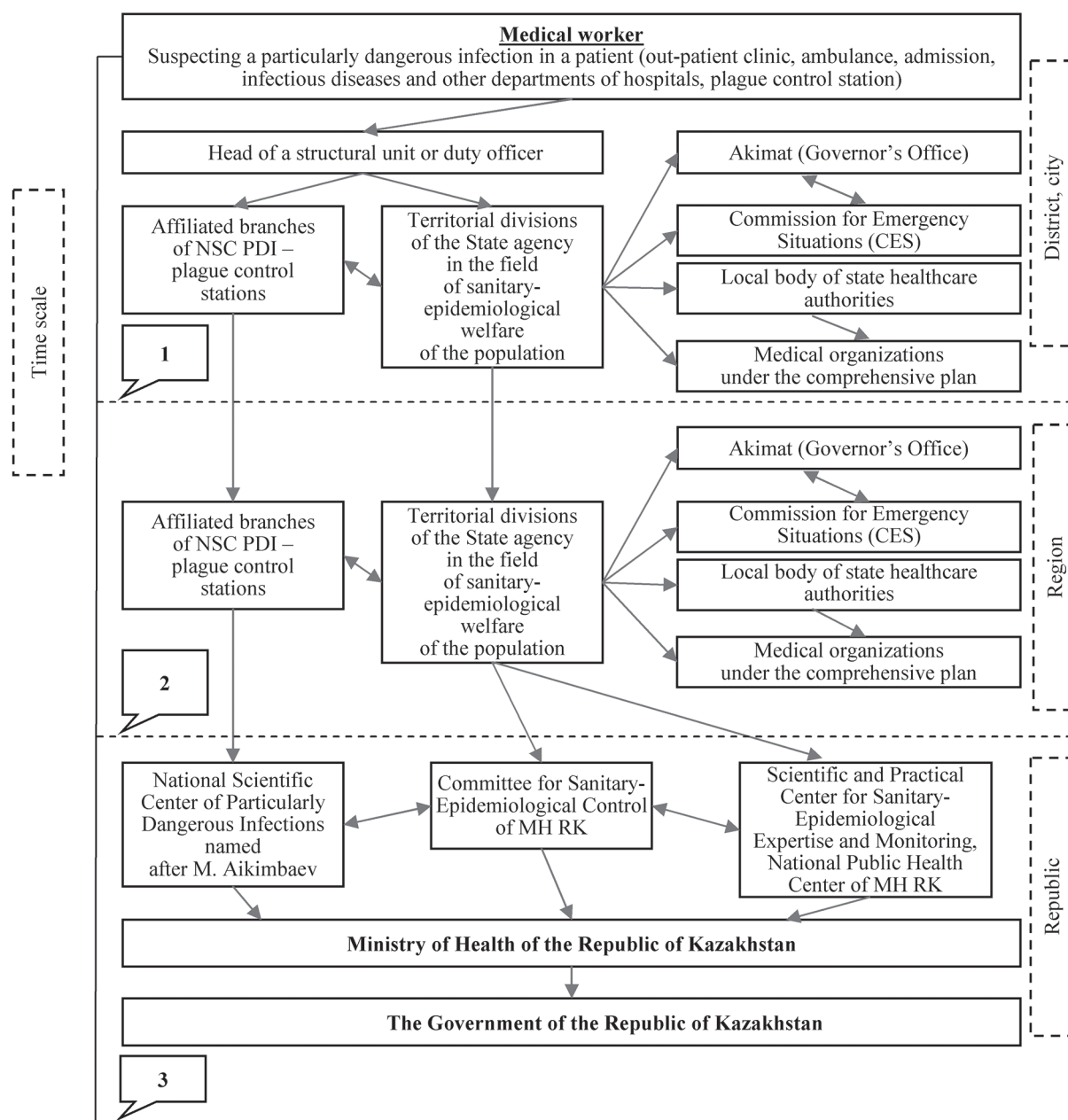


Fig. 2. Emergency notification scheme for a suspected case of particularly dangerous infection in the Republic of Kazakhstan:

NSC PDI, MH RK – National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections named after M. Aikimbaev of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan

за счет республиканского бюджета и/или бюджета территориального акимата. Важной задачей штаба ЧС является взаимодействие со средствами массовой информации для предоставления достоверной информации населению.

Кыргызская Республика. Существующая система здравоохранения Кыргызской Республики сформировалась в течение последних двух десятилетий в результате проведенных реформ здравоохранения. Санитарно-эпидемиологическое благополучие населения обеспечивается Службой общественного здравоохранения Министерства здравоохранения Кыргызской Республики (МЗ КР), которая включает организации республиканского и территориального уровней, осуществляющие медико-профилактическую и научно-исследовательскую деятельность (рис. 3).

Эпидемиологический надзор осуществляют: за инфекционными болезнями – центры профилактики заболеваний и госанэпиднадзора (ЦПЗиГСЭН), которые подают суммарную информацию об инфекционных заболеваниях по Ф-1 в Департамент профилактики заболеваний и госанэпиднадзора (ДПЗиГСЭН) ежемесячно, а в случаях подозрения на особо опасные болезни – немедленно; за чумой, сибирской язвой, бешенством, бруцеллезом и редкими инфекциями – Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций (РЦКиООИ). Мониторинг природных очагов чумы с эпидемиологическим, эпизоотологическим и лабораторным обследованием осуществляет РЦКиООИ и три его противочумных отделения, расположенные в городах Каракол, Ош и селе Атбаш, приуроченные к энзоотическим по чуме территориям [10].

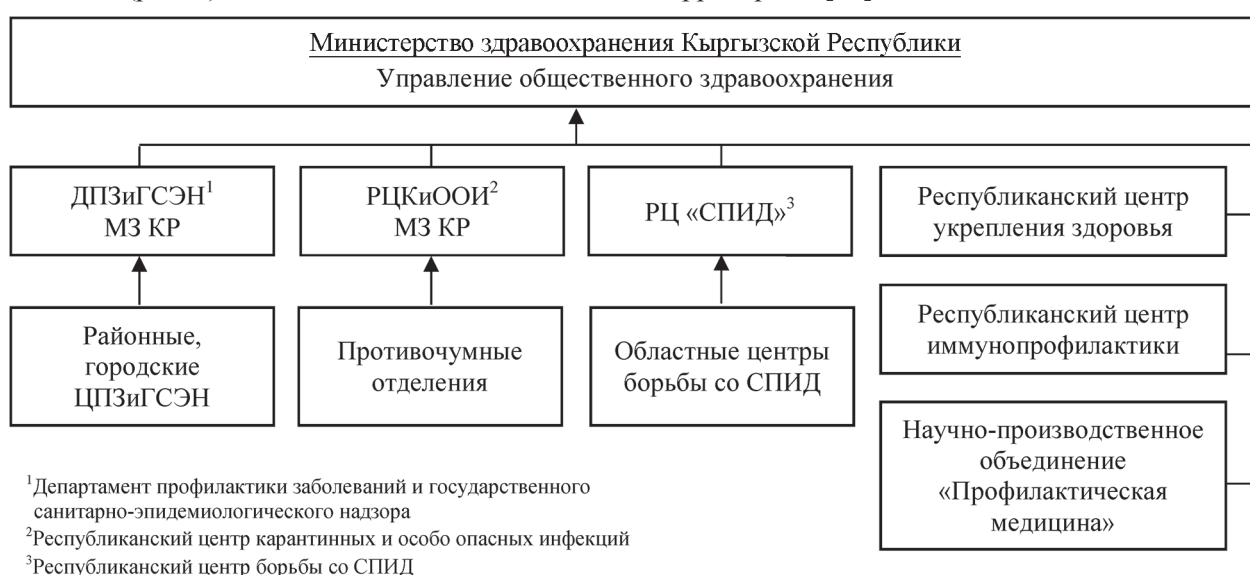


Рис. 3. Структура Службы общественного здравоохранения Министерства здравоохранения Кыргызской Республики

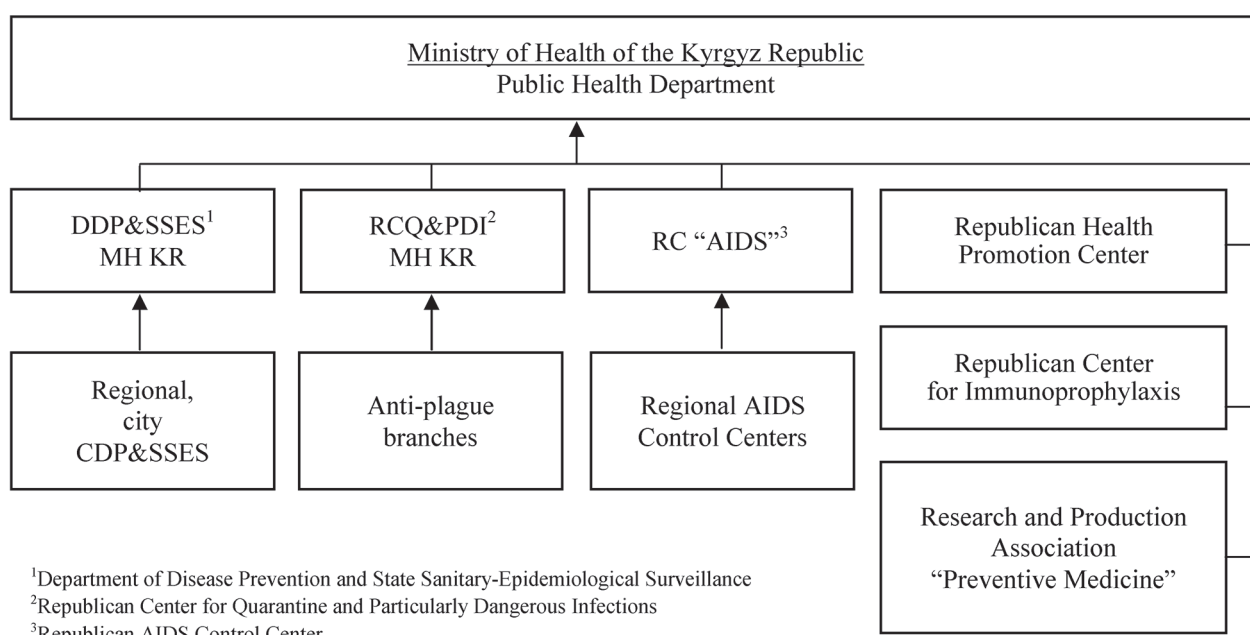


Fig. 3. Structure of the Public Health Service of the Ministry of Health, Kyrgyz Republic (KR)

Более 10 лет в стране работает онлайн-система сбора сведений об инфекционных заболеваниях. В республике осуществляется эпиднадзор за инфекционными и паразитарными заболеваниями. При подозрении на ООИ информация направляется в местный эпидемиологический центр на районном уровне (часто размещающийся в больнице). Из местной лаборатории положительные результаты по информмируемым заболеваниям направляются в референс-лабораторию для подтверждения.

Для оперативного реагирования на ЧС разработаны оперативные планы мероприятий, создана широкая сеть лабораторной службы. Операционный центр по ЧС в области общественного здравоохранения (ЦЧС) является основным местом координации оперативной информации и ресурсов для стратегического управления ЧС в области общественного здравоохранения и учений по их ликвидации. Он функционирует в соответствии с минимальными общими стандартами, поддерживает подготовленные действующие многоотраслевые бригады быстрого реагирования; обученный персонал ЦЧС способен приступить к скоординированным действиям по реагированию на ЧС в области общественного здравоохранения в течение 120 минут после ее выявления [1, 11].

В республике регулярно проводится и обновляется (не реже одного раза в год) картирование рисков и ресурсов с предоставлением актуализированной информации о ситуации в области общественного здравоохранения. Функционирует сеть наблюдения лабораторного контроля, которая позволяет оперативно отреагировать на ЧС. Остальные формирования (дезинфекционные бригады, группа санитарных врачей, специалистов и консультантов-эпидемиологов, инфекционистов, психологов и др.) привлекаются по конкретному случаю местными лечебно-профилактическими организациями (ЛПО), а также ЛПО второго и третьего уровней. Лабораторная база государственной санитарно-эпидемиологической службы включает лаборатории общественного здравоохранения национального уровня и ряда областных организаций (20 %), которые отвечают современным требованиям, и лаборатории районных и городских организаций общественного здравоохранения, которые имеют слабую материально-техническую базу.

Концепция государственной политики Российской Федерации в сфере содействия международному развитию, утвержденная Указом Президента РФ от 20.04.2014 № 259, включает в себя укрепление национальных систем здравоохранения, направленных на борьбу с распространением инфекционных заболеваний. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека при поддержке Правительства РФ осуществляется реализация целого ряда программ, ориентированных на внедрение и реализацию ММСП на пространстве СНГ, укрепление методологического, технологического, кадрового потенциала, усиление националь-

ных возможностей стран – партнеров Российской Федерации в области реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера и, как итог сотрудничества, создание единого эпидемиологического и информационного пространства, формирование и обеспечение функционирования единой системы мониторинга и оперативного реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера.

Основными направлениями взаимодействия являются укрепление материально-технической базы профильных учреждений стран СНГ, подготовка кадров, выполнение совместных научных работ и проведение экспедиций по мониторингу природных очагов инфекционных болезней.

С целью оказания материально-технической поддержки с 2015 по 2021 год в шесть стран СНГ поставлено 18 мобильных лабораторий различного профиля, а также 6 лабораторий из состава СПЭБ Роспотребнадзора. Переданные мобильные лаборатории используются для проведения эпизоотологического обследования природных очагов чумы и других опасных инфекционных болезней. С 2020 г. мобильные лаборатории активно задействованы для диагностики новой коронавирусной инфекции: и для усиления стационарных лабораторных баз, и для проведения диагностики в отдаленных и труднодоступных районах, не охваченных стационарной лабораторной сетью. Кроме мобильных лабораторий, осуществляются поставки странам-партнерам лабораторного оборудования, диагностических препаратов и расходных материалов.

Большое внимание уделяется подготовке кадров для совместной работы в составе команд оперативного реагирования, в том числе с использованием мобильных лабораторий. Начиная с 2015 г. подготовлено более 700 специалистов профильных учреждений стран СНГ по вопросам эпидемиологии и лабораторной диагностики. В октябре 2019 г. проведены первые межгосударственные учения команд быстрого реагирования стран СНГ на базе мобильного комплекса СПЭБ Роспотребнадзора. В учениях задействовано 80 специалистов профильных учреждений из 8 стран СНГ. На основании положительного опыта проведения учений в 2019 г., с целью продолжения укрепления региональной и глобальной систем противодействия инфекционным болезням и разработки единых подходов к борьбе с заболеваниями с эпидемическим потенциалом, в октябре 2021 г. в гибридном формате организованы первые международные учения мобильных лабораторий быстрого реагирования. Непосредственными участниками учений стали более 120 специалистов из России, Азербайджана, Армении, Беларуси, Кыргызстана, Казахстана, Узбекистана, Таджикистана, Бельгии, Франции, Германии и ВОЗ.

В рамках научного сотрудничества проводится программа по снижению риска возникновения эпидемических осложнений по чуме на природно-очаговых территориях. Внедрены единые алгорит-

мы эпизоотологического мониторинга и профилактики чумы и других инфекционных болезней. Реализованы программы помощи по элиминации кори, борьбе с ВИЧ/СПИД и другими инфекционными болезнями, противодействию выработке устойчивости к противомикробным препаратам в странах СНГ. Выполняются совместные проекты по молекулярно-генетическому мониторингу возбудителя новой коронавирусной инфекции и оценке популяционного иммунитета к SARS-CoV-2.

Для осуществления межгосударственного сотрудничества и взаимодействия в области санитарной охраны территории и обеспечения эпидемиологического благополучия населения Решением государств – участников СНГ от 22 ноября 2000 г. (г. Душанбе) создан Координационный совет по проблемам санитарной охраны территорий государств – участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней.

Координационным советом разработано нормативное обеспечение единой системы мониторинга и реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера на пространстве СНГ. Разработан и утвержден ряд межгосударственных документов: Соглашение о сотрудничестве в области санитарной охраны территорий государств – участников СНГ, Положение о порядке осуществления информационного обмена между государствами – участниками СНГ о чрезвычайных ситуациях в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера, Положение о базовой организации государств – участников СНГ по мониторингу, оперативному оповещению и совместному реагированию на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера. Решением 90-го заседания Экономического совета СНГ статус базовой организации придан ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Утверждено Положение о базовой организации. Для обеспечения информационного обмена в учреждения стран-партнеров (Армения, Азербайджан, Беларусь, Казахстан, Кыргызстан, Таджикистан, Узбекистан) поставлены автоматизированные рабочие места. Сформирован реестр специалистов организаций санитарно-эпидемиологического профиля государств – участников СНГ для совместной работы в зоне ЧС санитарно-эпидемиологического характера. Решением Совета по сотрудничеству в области здравоохранения СНГ от 30 июня 2020 г. одобрен проект Соглашения о сотрудничестве государств – участников СНГ по предупреждению и реагированию на ЧС в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера.

Поскольку прототипом национальных систем реагирования на ЧС являлась санитарно-эпидемиологическая служба СССР, эти системы в странах СНГ построены на одинаковых принципах и включают, как правило, национальный, региональ-

ный (субнациональный) и территориальный (местный) уровни реагирования, имеющие горизонтальные и вертикальные связи. Вопросы мониторинга и реагирования на ЧС регулируются на государственном уровне и входят в компетенцию ведомства, ответственного за обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Юридической основой являются документы законодательного уровня.

Таким образом, в результате реализации программ по содействию международному развитию в области противодействия инфекционным болезням, которые направлены на оказание научно-методической и материально-технической помощи в вопросах внедрения ММСП (2005 г.), достигнуто укрепление методологического, технологического, кадрового потенциала, усиление национальных возможностей стран СНГ в области борьбы с инфекционными болезнями и реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера. На сегодняшний день на пространстве СНГ фактически сформирована единая система мониторинга и оперативного реагирования на ЧС в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера, объединяющая более 15 профильных учреждений 8 стран СНГ.

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

Список литературы

1. Совместная внешняя оценка Кыргызстана. Отчет миссии ВОЗ, 28 ноября – 2 декабря 2016 г. ВОЗ; 2017. 87 с. [Электронный ресурс]. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255527/WHO-WHE-CPI-2017-22-rus.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (дата обращения 05.07.2022).
2. Joint external evaluation of IHR Core Capacities of the Republic of Armenia. Mission report: 15–19 August 2016. WHO; 2017. 73 p. [Электронный ресурс]. URL: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1081264/retrieve> (дата обращения 05.07.2022).
3. Шиянова А.Е., Топорков В.П., Дмитриева Л.Н., Кабаев С.Ю. Правовые основы Санитарно-эпидемиологических правил «Санитарная охрана территории Российской Федерации» (2008 г.) (материалы к Разделам I–IV СП 3.4.2318-08). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009; 2:38–43. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-2(100)-38-43.
4. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Ликвидация эпидемии Эбола в Гвинейской Республике: опыт работы специализированной противэпидемической бригады Роспотребнадзора М.: ООО «Творческий информационно-издательский центр»; 2016. 354 с.
5. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Рязанова А.Г., Кузнецова И.В., Гусарева О.А., Михайлова М.Е., Сирица Ю.В., Манин Е.А., Портенко С.А., Красовская Т.Ю., Куклев В.Е., Казакова Е.С., Данилевская М.М., Сафонова М.В., Тельнова Н.В., Иванова С.М., Лопатин А.А. Мобильные комплексы СПЭБ Роспотребнадзора как действенный инструмент при реализации мероприятий по противодействию новой коронавирусной инфекции COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 4:92–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-92-98.
6. Казакова Е.С., Шарова И.Н., Карнаухов И.Г., Портенко С.А., Красовская Т.Ю., Куклев В.Е., Найденова Е.В., Билько Е.А., Касьян И.А., Щербакова С.А., Топорков А.В. Опыт проведения диагностических исследований в мобильном комплексе специализированной противэпидемической бригады Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» в период проведения массовых мероприятий. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2014; 24:27–9.
7. Министерство здравоохранения Республики Беларусь. [Электронный ресурс]. URL: <http://minzdrav.gov.by/ru/>

ministerstvo/struktura/sanitarnaya-sluzhba/index.php (дата обращения 05.07.2022).

8. Казаков С.В., Есмагамбетова А.С., Кобжасаров Д.А., Шарипова С.Ф., Суендыкова Г.Ш., Смагул М.А., Казакова Г.Н., Ельчибеков Р.Т., Сайрамбекова Г.М., Касабекова Л.К. Этапы создания и перспективы внедрения электронной интегрированной системы надзора за заболеваниями. *Окружающая среда и здоровье населения*. 2016; 4:7–11.

9. Ерубаев Т.К., Есмагамбетова А.С., Турегелдиева Д.А., Мека-Меченко Т.В., Некрасова Л.Е., Избанова У.А. Индикаторы оценки биобезопасности лабораторий, работающих с опасными инфекционными агентами, в Республике Казахстан. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2019; 2:76–87.

10. Абдикаримов С.Т., Ибрагимов Э.Ш., Эгембергенев Ч.Э. Современное эпизоотическое состояние природных очагов чумы Кыргызской Республики и мероприятия, направленные на обеспечение эпидемиологического благополучия по чуме. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 2:45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-45-48.

11. Результаты самооценки выполнения основных оперативных функций общественного здравоохранения (ОФОЗ) в Кыргызской Республике, апрель-декабрь 2016 г. Бишкек, 2017. 94 с. [Электронный ресурс]. URL: http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0008/355868/KGZ_RUS_WHO_web.pdf (дата обращения 05.07.2022).

References

1. [Joint external evaluation of Kyrgyzstan. WHO mission report, November 28 – December 2, 2016]. WHO; 2017. 87 p. (Cited 05 Jul 2022). [Internet]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255527/WHO-WHE-CPI-2017.22-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

2. Joint external evaluation of IHR Core Capacities of the Republic of Armenia. Mission report: 15–19 August 2016. WHO; 2017. 73 p. (Cited 05 Jul 2022). [Internet]. Available from: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1081264/retrieve>.

3. Shiyanova A. E., Toporkov V. H., Dmitrieva L.N., Kabaev S. Yu. [Legal basis of sanitary and epidemiologic regulations “Sanitary protection of the Russian Federation territory” (2008) (Materials for Issues I–IV SR 3.4.2318-08)]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2009; (2):38–43. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-2(100)-38-43.

4. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Eradication of the Ebola Epidemic in the Republic of Guinea: Operational Experience of the Specialized Anti-Epidemic Team of Rospotrebnadzor]. Moscow: LLC “Creative Information and Publishing Center”; 2016. 354 p.

5. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Ryazanova A.G., Kuznetsova I.V., Gnusareva O.A., Mikhailova M.E., Siritsa Yu.V., Manin E.A., Portenko S.A., Krasovskaya T.Yu., Kuklev V.E., Kazakova E.S., Danilevskaya M.M., Safonova M.V., Tel'nova N.V., Ivanova S.M., Lopatin A.A. [Mobile complexes of the specialized anti-epidemic teams (SAET) of the Rospotrebnadzor as an effective tool in the implementation of measures to counter new coronavirus infection COVID-19]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (4):92–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-92-98.

6. Kazakova E.S., Sharova I.N., Karnaukhov I.G., Portenko S.A., Krasovskaya T.Yu., Kuklev V.E., Naydenova E.V., Bil'ko E.A., Kas'yan I.A., Shcherbakova S.A., Toporkov A.V. [Experience of diagnostic studies in a mobile complex of the specialized anti-epidemic team of RusRAPI “Microbe” during mass events]. *Dal'nevostochny Zhurnal Infektsionnoy Patologii [Far East Journal of Infectious Pathology]*. 2014; 24:27–9.

7. [Ministry of Health of the Republic of Belarus]. (Cited 05 Jul 2022). [Internet]. Available from: <http://minzdrav.gov.by/ru/ministerstvo/struktura/sanitarnaya-sluzhba/index.php>.

8. Kazakov S.V., Esmagambetova A.S., Kobzhasarov D.A., Sharipova S.F., Suendykova G.Sh., Smagul M.A., Kazakova G.N., El'chibekov R.T., Sairambekova G.M., Kasabekova L.K. [Stages of creation and prospects for the implementation of an electronic integrated disease surveillance system]. *Okruzhayushchaya Sreda i Zdorov'ye Naseleniya [Environment and Public Health]*. 2016; (4):7–11.

9. Erubaev T.K., Esmagambetova A.S., Turegeldieva D.A., Meka-Mechenko T.V., Nekrasova L.E., Izbanova U.A. [Indicators for assessing the biosafety of laboratories working with dangerous infectious agents in the Republic of Kazakhstan]. *Karantinnye i Zoonoznye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. 2019; (2):76–87.

10. Abdikarimov S.T., Ibragimov E.S., Egembergenov C.E. [Current epizootic condition of natural plague foci in Kyrgyz Republic and measures aimed at provision of epidemiological welfare as regards plague]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (2):45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-45-48.

11. [Results of self-assessment of key public health operations implementation (KPHOs) in the Kyrgyz Republic, April–December 2016]. Bishkek; 2017. 94 p. (Cited 05 Jul 2022). [Internet]. Available from: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0008/355868/KGZ_RUS_WHO_web.pdf.

Authors:

Kutyrev V.V., Shcherbakova S.A., Karnaukhov I.G., Kas'yan Zh.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Shiyanova A.E. Plague Control Center. 4, Musorgskogo St., Moscow, 127490, Russian Federation. E-mail: protivochym@nln.ru.

Gorbunov V.A., Kras'ko A.G., Semizhon P.A., Rustamova L.M., Petkevich A.S. Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology. Minsk, Republic of Belarus.

Leshkevich A.L., Fedorovich E.V. Republican Center of Hygiene, Epidemiology and Public Health. Minsk, Republic of Belarus.

Erubaev T.K., Ayazbaev T.Z., Turegeldieva D.A., Kovaleva G.G. National Scientific Center for Particularly Dangerous Infections named after M. Aikimbaev. Alma-Ata, Republic of Kazakhstan.

Berdiev S.K., Usenbaev N.T., Kazybaeva Zh.S. Republican Center for Quarantine and Particularly Dangerous Infections. Bishkek, Kyrgyz Republic.

Об авторах:

Кутырев В.В., Щербакова С.А., Карнаухов И.Г., Касьян Ж.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Шиянова А.Е. Противочумный центр. Российская Федерация, 127490, Москва, ул. Мусоргского, 4. E-mail: protivochym@nln.ru.

Горбунов В.А., Красько А.Г., Семижон П.А., Рустамова Л.М., Петкевич А.С. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии. Республика Беларусь, Минск.

Лешкевич А.Л., Федорович Е.В. Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья. Республика Беларусь, Минск.

Ерубаев Т.К., Аязбаев Т.З., Турегелдиева Д.А., Ковалева Г.Г. Национальный научный центр особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева. Республика Казахстан, Алма-Ата.

Бердиев С.К., Усенбаев Н.Т., Казыбаева Ж.С. Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций. Кыргызская Республика, Бишкек.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-107-114

УДК 616.932:579:61

Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, О.А. Якушева, Л.П. Алексеева,
С.О. Водопьянов, М.И. Ежова, А.К. Носков

Изучение диапазона изменчивости по агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных при мониторинговых исследованиях

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

Цель исследования – ретроспективный анализ диапазона вариабельности антигенных свойств и генотипических характеристик атипичных по агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae* R-варианта. **Материалы и методы.** Изучено 169 атипичных по агглютинабельности штаммов холерных вибрионов *V. cholerae* R-варианта с применением тест-системы «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL». Определение O1-антигена осуществляли с помощью набора реагентов «Иг – *V. cholerae* O1/O139 – ИФА/дот-ИФА». **Результаты и обсуждение.** Проведен ретроспективный анализ комплекса фено- и генотипических характеристик штаммов, изолированных в ходе мониторинга за 30-летний период из поверхностных водоемов на территориях трех бывших республик СССР и 13 субъектов Российской Федерации и идентифицированных при выделении как нетоксигенные штаммы *V. cholerae* R-варианта. При повторной идентификации установлено, что штаммы относились как к эпидемически опасным (3,0 %), так и к неопасным (97,0 %). Диапазон изменчивости выразился в их распределении на три группы и заключался в сохранении агглютинабельности только сывороткой холерной RO в первой группе (34,5 % штаммов); утрате этого признака, но приобретении способности агглютинироваться в разных сочетаниях сыворотками O1, Огава или Инаба – во второй (16,7 %); а также в потере агглютинабельности со всеми диагностическими холерными сыворотками – в третьей (48,8 %). Установленное наличие гена *wbeT* у взятого в сравнение штамма *V. cholerae* classical R-варианта не исключает наличия геномной области биосинтеза O1-антигена у других R-штаммов, возможно, в измененной форме, что может быть уточнено в дальнейших молекулярно-генетических исследованиях. В альтернативном случае такие штаммы, по-видимому, могут быть отнесены к *V. cholerae* nonO1/nonO139. Выявлены штаммы *V. cholerae* R-варианта с различным количеством поверхностного антигена (диапазон оптической плотности – от $0,088 \pm 0,002$ до $1,226 \pm 0,003$). Полученные данные могут использоваться при мониторинге холеры в лабораториях регионального и федерального уровней.

Ключевые слова: холерный вибрион, R-вариант, изменчивость, агглютинабельность, фено- и генотип, мониторинг, объекты окружающей среды.

Корреспондирующий автор: Левченко Дарья Александровна, e-mail: levchenko_da@antiplague.ru.

Для цитирования: Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Якушева О.А., Алексеева Л.П., Водопьянов С.О., Ежова М.И., Носков А.К. Изучение диапазона изменчивости по агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных при мониторинговых исследованиях. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:107–114. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-107-114

Поступила 11.09.2020. Отправлена на доработку 30.11.2020. Принята к публ. 15.06.2022.

D.A. Levchenko, V.D. Kruglikov, I.V. Arkhangel'skaya, O.A. Yakusheva, L.P. Alekseeva,
S.O. Vodop'yanov, M.I. Ezhova, A.K. Noskov

Assessment of the Variation Range of Agglutinability in *Vibrio cholerae* Strains Isolated in the Course of Monitoring Studies

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

Abstract. The aim of the study was to retrospectively analyze the range of variability of antigenic properties and genotypic characteristics of *Vibrio cholerae* R-variant strains atypical in terms of agglutinability. **Materials and methods.** 169 strains of *V. cholerae* R-variant with atypical agglutinability have been studied using the “AmpliSens® *Vibrio cholerae*-FL” test-system. The determination of O1 antigen was carried out using the “Ig-*V. cholerae* O1/O139 – ELISA/dot-ELISA” reagent kit. **Results and discussion.** A retrospective analysis of the complex of pheno- and genotypic characteristics of strains isolated from surface water bodies in the territories of three former Soviet republics and 13 constituent entities of the Russian Federation in the course of 30-year monitoring and identified upon isolation as non-toxicogenic *V. cholerae* R-variant strains has been performed. Upon re-identification, it was found that the strains belong to both epidemically dangerous (3.0 %) and non-dangerous strains (97.0 %). The range of variability was expressed in their distribution into three groups and consisted in retaining of agglutinability only with cholera RO serum in the first group (34.5 % of strains); the loss of this trait, but the acquisition of the ability to agglutinate in different combinations with O1, Ogawa or Inaba sera – in the second (16.7 %); and also in the loss of agglutinability with all diagnostic cholera sera – in the third (48.8 %). The presence of the *wbeT* gene in the compared *V. cholerae* classical R-variant strain does not exclude the presence of the genomic region for O1 antigen biosynthesis in other R-strains, possibly in a modified form, which can be clarified in further molecular-genetic studies. Alternatively, such strains are likely to be attributed to *V. cholerae* nonO1/nonO139. Strains of *V. cholerae* R-variant with different amounts of surface antigen (optical density range – from 0.088 ± 0.002 to 1.226 ± 0.003) have been identified. The data obtained can be used for monitoring of cholera in laboratories of regional and federal levels.

Key words: *Vibrio cholerae*, R-variant, variability, agglutinability, phenotype and genotype, monitoring, environmental objects.

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

Corresponding author: Dar'ya A. Levchenko, e-mail: levchenko_da@antiplague.ru.

Citation: Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Vodop'yanov S.O., Ezhova M.I., Noskov A.K. Assessment of the Variation Range of Agglutinability in *Vibrio cholerae* Strains Isolated in the Course of Monitoring Studies. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections)*. 2022; 3:107–114. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-107-114

Received 11.09.2020. *Revised* 30.11.2020. *Accepted* 15.06.2022.

Levchenko D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4676-0377>
Kruglikov V.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6540-2778>
Arkhangel'skaya I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7569-8584>
Yakusheva O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8159-7547>

Alekseeva L.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9866-3579>
Vodop'yanov S.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>
Ezhova M.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4254-3313>
Noskov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Главной задачей мониторинговых исследований на холеру, как известно, является выявление в объектах окружающей среды (ООС) штаммов холерных вибрионов серогрупп O1, O139 и определение их эпидемической опасности. Идентификация, проводимая с помощью реакции агглютинации холерными диагностическими серогрупповыми и серовар-специфическими сыворотками (O1, O139, Огава, Инаба и RO), в большинстве случаев позволяет достаточно легко дифференцировать представителей O1-серогруппы от штаммов O139 и nonO1/nonO139 (МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры»). Вместе с тем встречаются отдельные штаммы, не агглютинирующиеся перечисленными сыворотками, кроме RO, и определение их истинной серогрупповой принадлежности вызывает определенные затруднения. Такие штаммы, обозначаемые как R-варианты, обычно практически не отличаются от других холерных вибрионов по морфологии колоний, культуральным и биохимическим свойствам; различия касаются только агглютинабельности серогрупповыми и сероварспецифическими сыворотками. Для более точной дифференциации необходима ПЦР-детекция генов *wbeT* и *wbfR*, строго специфичных для представителей соответствующих серогрупп, которая проводится наряду с выявлением гена А-субъединицы холерного токсина (*ctxA*) и структурной единицы токсин-корегулируемых пилей (*tcpA*), что позволяет определить наличие/отсутствие эпидемической опасности. Зарубежными исследователями установлено, что некоторые R-варианты, выделенные от больных холерой в Индии и Бангладеш, не только содержали гены *ctxA* и *tcpA*, но также продуцировали холерный токсин (СТ) *in vitro* в таких же, а иногда даже в больших количествах по сравнению с типичными (S-варианты) *Vibrio cholerae* [1–3]. Они также не уступали S-вариантам в способности к токсинопродукции и адгезивной активности в экспериментах *in vivo* [3]. В их геномах были выявлены детерминанты *wbe*-O1 (у одного – *wbf*-O139), однако соответствующими сыворотками они не агглютинировались, проявляя специфичность только к RO-сыворотке [1, 2]. Таким образом, токсигенные R-варианты могут представлять эпидемическую опасность, в связи с чем их надежная идентификация крайне актуальна.

Данные микробиологического мониторинга холеры за последние три десятилетия свидетельствуют об обнаружении в клиническом материале и в основном в пробах из объектов окружающей среды на территориях бывшего СССР и субъектов

Российской Федерации штаммов холерных вибрионов, атипичных по признаку агглютинабельности [4, 5]. В результате идентификации (после выделения) установлено, что указанные штаммы типичны по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам, но агглютинировались в диагностических титрах только диагностической сывороткой холерной RO, на основании чего были отнесены к *V. cholerae* RO. При использовании методов, актуальных на время проведения их идентификации, эти штаммы охарактеризованы как эпидемически неопасные (нетоксигенные). В большинстве случаев их принадлежность к O1-серогруппе методом ПЦР не определена (МР 01-19/55-17 «Методические рекомендации по мониторингу окружающей среды за контаминацией холерными вибрионами на территории Российской Федерации», 1995). Атипичность штаммов *V. cholerae* O1 по признаку агглютинабельности объяснялась процессами адаптации к воздействию неблагоприятных условий окружающей среды, приводящих к формированию новых антигенных вариантов за счет изменения боковых цепей липополисахарида (ЛПС), отвечающих за серологическую специфичность штаммов *V. cholerae*, а также утратой сахаров, характерных для S-форм холерного вибриона, и другими причинами, связанными с потерей O-специфичности [6].

И.Я. Черепahiной с соавт. [5] установлено наличие двух вариантов штаммов среди холерных вибрионов RO: R и SR. Так, штаммы *V. cholerae* O1, агглютинирующиеся только диагностической холерной сывороткой RO, отнесены к R-варианту, а к SR-варианту – штаммы, характеризующиеся способностью агглютинироваться в разных сочетаниях диагностическими сыворотками холерными, в том числе и RO. Необходимо отметить, что в данном случае речь идет об R-вариантах (от англ. *rough* – шероховатые), а не о ругозных (от англ. *rugose* – морщинистые, складчатые), существенно отличающихся от типичных по морфологии колоний [3, 7]. Они не растут на питательных средах, используемых при проведении лабораторной диагностики холеры, вследствие чего не являются актуальными при мониторинговых исследованиях [8]. Вместе с тем при длительном хранении в лиофильно высушенном состоянии не исключена возможность сероконверсии и/или утраты агглютинабельности диагностическими сыворотками холерными из-за остановки метаболических процессов в клетках микроорганизмов, что снижает их защищенность от окислительных реакций [9].

Представляется актуальным уточнение изначального определения таксономической принадлежности и эпидемической опасности штаммов, идентифицированных при выделении как *V. cholerae* R-варианта. То есть, наряду с выявлением способности агглютинироваться только сывороткой RO в диагностическом титре, важно определить наличие/отсутствие генов *ctxA*, *tcpA*, *wbe*-O1 и *wbf*-O139. Обнаружение ампликона *wbe*-O1 дает возможность выдачи ответа о наличии/отсутствии принадлежности штаммов *V. cholerae* R-варианта к атипичным по агглютинабельности штаммам O1-серогруппы. В связи с этим для дальнейшего совершенствования диагностики представляется целесообразным повторное комплексное изучение музейных штаммов *V. cholerae* R-варианта по фено- и генотипическим признакам.

Целью настоящего исследования является ретроспективный анализ диапазона варибельности антигенных свойств и генотипических характеристик атипичных по агглютинабельности штаммов *V. cholerae* R-варианта.

Материалы и методы

В работе использованы 169 атипичных по агглютинабельности штаммов холерных вибрионов *V. cholerae* R-варианта, из которых 168 штаммов, выделенных из ООС на территориях бывшего СССР и субъектов РФ, ранее были отнесены к эпидемически неопасным (нетоксигенным) и один эпидемически опасный штамм *V. cholerae* R-варианта (№ 16197/1), выделенный от больного в Калькутте (Индия) [10].

Все штаммы с момента поступления и идентификации хранились в лиофильно высушенном состоянии в музее живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института.

Определение биологических свойств штаммов *V. cholerae* проводили в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». При проведении ПЦР-анализа использовали набор реагентов для выявления ДНК *V. cholerae* и идентификации патогенных штаммов *V. cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» в соответствии с инструкцией.

Для детекции O1-антигена методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) применяли набор реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ТИФА и дот-ИФА» («Иг – *V. cholerae* O1/O139 – ИФА/дот-ИФА») согласно прилагаемой инструкции [11]. Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре BioTekEL*800 (BioTek Instruments, США) при длине волны 450 нм (референс-волна – 630 нм).

Серологическую идентификацию холерных вибрионов серогрупп nonO1/nonO139 проводили диа-

гностическими кроличьими моноспецифическими сыворотками против типовых штаммов холерных вибрионов серогрупп O2–O83 в реакции слайд-агглютинации (МУК 4.2.2218-07). При анализе результатов использованы параметрические статистические методы ($P < 0,05$) [12]. Все исследования проводили в трех повторностях.

Результаты и обсуждение

Проведен анализ данных паспортов на взятые в исследование штаммы, которые выделены из ООС на территориях бывшего СССР и субъектов РФ в ходе микробиологического мониторинга за период 1988–2019 гг. В результате установлено, что из 168 штаммов, идентифицированных как *V. cholerae* R-варианта, большинство изолировано на территории бывшей Казахской ССР и в Приморском крае РФ.

На первом этапе, по результатам проведенных нами ретроспективных исследований, штаммы, первично идентифицированные как нетоксигенные *V. cholerae* R-варианта, распределены на три группы по критериям агглютинабельности диагностическими холерными сыворотками в диагностическом титре, по эпидемической опасности (наличие/отсутствие генов *ctxA* и *tcpA*) и серогрупповой принадлежности (детекция генов *wbeT* и *wbfR*), что представлено в табл. 1.

К первой группе (R) отнесены 34,5 % штаммов *V. cholerae* от общего числа изучаемых культур. Эта группа, названная нами «консервативная» и обозначенная как R-вариант, включала штаммы, которые агглютинируются только диагностической сывороткой холерной RO от 1/2 диагностического титра и у которых отсутствовал ген *wbeT*. Генотип: $hly^+ctxA^+tcpA^-wbeT^-wbfR^-$.

Вторая группа (SR-варианты), условно обозначенная как «гетерогенная», состояла из 16,7 % штаммов и представлена как токсигенными *V. cholerae* O1, так и нетоксигенными. Штаммы агглютинировались серогрупповой (O1) и сероварспецифическими (Огава или Инаба) диагностическими холерными сыворотками в диагностических титрах в различных сочетаниях, содержали ген *wbeT* и имели разные генотипы: $hly^+ctxA^+tcpA^+wbeT^+wbfR^-$; $hly^+ctxA^+tcpA^+wbeT^+wbfR^+$; $hly^+ctxA^+tcpA^-wbeT^+wbfR^-$. Эпидемически опасные штаммы холерных вибрионов с генотипом $hly^+ctxA^+tcpA^+wbeT^+wbfR^-$ выделены на территории бывшего СССР (Казахская ССР, 1988 г. – три штамма). Третья группа штаммов, условно названная «не агглютинирующаяся», оказалась самой многочисленной, включала 48,8 % нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, которые не агглютинировались диагностическими сыворотками холерными, в том числе RO, и поэтому были отнесены к группе штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 с генотипом $hly^+ctxA^+tcpA^-wbeT^-wbfR^-$. Таким образом, полученные результаты привели к уменьшению количества территорий, на которых из ООС выде-

Таблица 1 / Table 1

Характеристика штаммов холерных вибрионов, выделенных из ООС, по биологическим признакам

Biological characteristics of *Vibrio cholerae* strains isolated from environmental objects

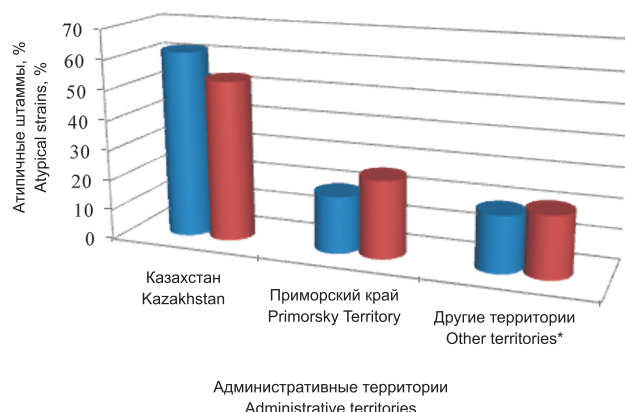
Наименование признака The name of the feature	R-вариант R-variant	SR-вариант SR-variant	nonO1/nonO139
Агглютинабельность диагностическими холерными сыворотками Agglutinability with diagnostic cholera sera			
Сыворотка RO в диагностическом титре RO serum in the diagnostic titer	+	–	–
Сыворотками O1, Огава или Инаба O1, Ogawa and Inaba sera	–	+/-	–
Генотипическая характеристика Genotypic characteristics			
<i>hly</i>	+	+	+
<i>ctxA</i>	–	+/-	–
<i>tcpA</i>	–	+/-	–
<i>wbeT</i>	–	+	–
<i>wbfR</i>	–	–	–
Количество штаммов Number of strains	58	28	82
Итого Total	168		

лялись штаммы *V. cholerae* R-варианта, и удельного веса атипичных штаммов (в %) от общего количества (58 штаммов) за период с 1988 по 2019 год (рисунок).

Для более наглядной характеристики диапазона изменчивости по агглютинабельности, эпидемической опасности и особенностей генотипов произведена случайная выборка из 11 штаммов *V. cholerae*, куда вошли штаммы из трех вышеописанных групп (табл. 2). Для сравнения дополнительно взят эпидемически опасный R-вариант штамма *V. cholerae classical* (№ СА 385), выделенный от больного в Калькутте (Индия).

В результате проведенных исследований установлено (табл. 2), что четыре штамма, идентифицированные при поступлении как нетоксигенные *V. cholerae* R-варианты, при повторной идентификации отнесены к SR-вариантам. У трех из них установлена эпидемическая опасность ($hly^+ctxA^+tcpA^+wbeT^+wbfR^-$). У одного нетоксигенного штамма выявлено наличие токсин-корегулируемых пилей адгезии ($hly^+ctxA^+tcpA^+wbeT^+wbfR^-$). Шесть других штаммов сохранили агглютинабельность только RO-сывороткой, имели генотип $hly^+ctxA^-tcpA^-wbeT^-wbfR^-$, в то время как штамм *V. cholerae classical* R-варианта имел генотип $hly^+ctxA^+tcpA^+wbeT^+wbfR^-$. Штамм № 548 отнесен к *V. cholerae nonO1/nonO139*, так как не агглютинировался диагностическими сыворотками холерными, в том числе RO, и имел генотип $hly^+ctxA^-tcpA^-wbeT^-wbfR^-$.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности представления в последующих исследованиях данных комплексного анализа геномов разных групп штаммов.



Удельный вес выделенных из ООС на различных административных территориях штаммов холерных вибрионов R-варианта (%) за период с 1988 по 2019 год:

■ – процент от общего числа выделенных атипичных по агглютинабельности штаммов за изучаемый временной период (исходная идентификация); ■ – процент от общего числа выделенных штаммов холерных вибрионов R-варианта за изучаемый временной период после повторной идентификации; * – Каракалпакия, Таджикистан, Республика Калмыкия, Крым, Амурская, Иркутская, Ленинградская, Московская, Новосибирская, Ростовская, Рязанская области, Забайкальский, Краснодарский, Хабаровский края

The proportion of environmental R-variant *Vibrio cholerae* strains isolated in different administrative territories (%) over the period between 1988 and 2019:

■ – percent of the total number of strains with atypical agglutinability isolated during the studied time period (initial identification); ■ – percent of the total number of strains of *Vibrio cholerae* R-variant isolated during the studied time period (after re-identification); * – Karakalpakstan, Tajikistan, Republic of Kalmykia, Crimea, Amur, Irkutsk, Leningrad, Moscow, Novosibirsk, Rostov, Ryazan Regions, Transbaikal, Krasnodar, Khabarovsk Territories

Диапазон изменчивости поверхностной антигенной структуры выборки атипичных штаммов холерных вибрионов охарактеризован в ТИФА с использованием моноклональных антител (МКА) к ЛПС O1 (табл. 3).

Таблица 2 / Table 2

 Характеристика выборки штаммов холерных вибрионов
 Characteristics of selected *Vibrio cholerae* strains

№ штамма Strain No.	Год выделения Year of isolation	Административная территория Administrative territory	Агглютинабельность холерными сыворотками Agglutinability with cholera sera								Генетическая характеристика Genetic characteristics			Группы штаммов Groups of <i>V. cholerae</i> strains
			O1		Огава Ogawa		Инаба Inaba		RO		ctxA	tcpA	wbeT	
			1	2	1	2	1	2	1	2				
1317	1988	Казахская ССР (вода) The Kazakh SSR (water)	–	1/1600	1/100	1/400	–	–	1/400	–	+	+	+	SR
1375	1988	Казахская ССР (вода) The Kazakh SSR (water)	–	1/800	1/100	1/400	–	–	1/800	–	+	+	+	
1606	1988	Казахская ССР (вода) The Kazakh SSR (water)	1/100	1/1600	1/100	1/800	–	–	1/400	–	+	–	+	
77	1994	Новосибирская обл. (вода) The Novosibirsk Region (water)	1/2000	1/1600	1/1600	–	–	–	1/800	–	–	+	+	
73-RO	1991	Приморский край (вода) Primorsky Territory (water)	–	–	–	–	–	–	1/800	1/800	–	–	–	R
155	1994	Новосибирская обл. (вода) Novosibirsk Region (water)	–	–	–	–	–	–	1/800	1/400	–	–	–	
227	1999	Ленинградская обл. (вода) Leningrad Region (water)	–	–	–	–	–	–	1/800	1/400	–	–	–	
104	2002	Новосибирская обл. (вода) Novosibirsk Region (water)	–	–	–	–	–	–	1/1600	1/800	–	–	–	
120	2017	Ростовская обл. (вода) Rostov Region (water)	–	–	–	–	–	–	1/400	1/400	–	–	–	nonO1/nonO139
1-19	2019	Иркутская обл. (вода) Irkutsk Region (water)	–	–	–	–	–	–	1/800	1/800	–	–	–	
CA 385	1953	Калькутта (Индия) (больной) Calcutta (India) (patient)	–	–	–	–	–	–	1/800	1/800	+	+	+	
548	2007	Краснодарский край (вода) Krasnodar Territory (water)	–	–	–	–	–	–	1/800	–	–	–	–	

 Примечание: 1 – данные по паспорту; 2 – результаты повторной идентификации; ген *wb/r* отсутствовал у всех штаммов; все штаммы имели ген *hly*;

 Note: 1 – the data contained in the certificate; 2 – results of re-identification; *wb/r* gene was absent in all strains; all strains had the *hly* gene.

При анализе результатов изучения выборки штаммов холерных вибрионов, представленной семью штаммами *V. cholerae* R-варианта, четырьмя – SR-варианта и одним – *V. cholerae* nonO1/nonO139, выявлено, что значения ОП в ТИФА с МКА к ЛПС O1 варьировали от значений K^- до K^+ . Так, штаммы холерных вибрионов, отнесенные к SR-варианту, в ТИФА имели различную антигенную характеристику. Интерес вызвал штамм *V. cholerae* O1 № 1317 (ОП=0,128±0,002), который не вступал во взаимодействие с МКА к ЛПС O1, но агглютинировался холерной диагностической сывороткой O1 в титре 1/1600 и имел ген *wbeT*. Полученные результаты свидетельствовали о возможном изменении или повреждении структурных компонентов поверхностного антигена вышеуказанных штаммов. Остальные культуры холерных вибрионов (SR) имели различную ОП – от (0,674±0,002) до (1,28±0,01) нм, что подтверждало, наряду с наличием гена *wbeT* и агглютинабельности холерными диагностическими сыворотками (O1, Огава, Инаба), их принадлежность к O1-серогруппе. Штаммы из ООС, идентифицированные как *V. cholerae* R-варианта (№ 73-RO, 155, 227, 104, 120 и 1-19), не взаимодействовали с МКА к ЛПС O1, имели ОП от (0,069±0,01) до (0,197±0,014) нм и не содержали ген *wbeT*. Однако у штамма *V. cholerae classical* R-варианта № CA 385, изолированного от человека, при сравнимом значении ОП (0,197±0,014) определялся ген *wbeT*. Возможно, отрицательный результат по детекции гена *wbeT* у штаммов из ООС был получен вследствие наличия изменений в генети-

ческой детерминированности признака принадлежности к O1-серогруппе, что требует проведения полной характеристики и анализа структуры набора генов биосинтеза O1-антигена. У штамма № 548 отмечалось низкое значение ОП, что дополнительно подтвердило его принадлежность к *V. cholerae* nonO1/nonO139.

По результатам типирования диагностическими кроличьими моноспецифическими сыворотками против типовых штаммов холерных вибрионов серогрупп O2–O83, штамм № 548 отнесен к O35-серогруппе. В то же время штаммы № 227 и O104, отнесенные к R-группе, агглютинировались сыворотками O76 и O30 соответственно. Данный факт свидетельствовал о возможности их принадлежности к *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Таким образом, представляется важным изучение комплекса фено- и генотипических характеристик штаммов *V. cholerae* R-варианта, выделенных в ходе мониторинга за последние 30 лет из ООС на территориях трех бывших республик СССР и 13 субъектов РФ, в связи с затруднением определения их принадлежности к атипичным по агглютинабельности штаммам *V. cholerae* O1 при отсутствии детекции участков кластера *wbe*-O1; с необходимостью установления эпидемической опасности с использованием современного метода ПЦР-диагностики; с возможными изменениями серологических характеристик в результате длительного хранения в лиофильно высушенном состоянии.

Так, проведенное сравнительное изучение вариативности биологических свойств позволило разделить 168 исследуемых штаммов, обнаруженных в ООС, на три группы и выявить различия между ними по ряду свойств, таких как агглютинабельность холерными серогрупповой (O1) и сероварспецифическими (Огава или Инаба) диагностическими холерными сыворотками. Результаты анализа собственных и литературных данных указывают на приоритетность данных ПЦР при решении вопроса о серогрупповой принадлежности R-вариантов холерных вибрионов O1 (по наличию амплификации мишени *wbeT*) и O139 (*wbfR*). При этом диапазон изменчивости штаммов, определенных при выделении как *V. cholerae* R-варианта, заключался в том, что первая группа штаммов («консервативная – R») сохранила агглютинабельность только диагностической сывороткой холерной RO, в то время как вторая («гетерогенная – SR») – утратила этот признак, но приобрела способность агглютинироваться в разных сочетаниях сыворотками диагностическими холерными O1, Огава или Инаба; а третья («не агглютинирующая – nonO1/nonO139») – потеряла агглютинабельность со всеми сыворотками, и штаммы этой группы определены как *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Установление наличия гена *wbeT* у взятого в сравнение штамма *V. cholerae classical* R-варианта, выделенного от человека, не исключает полностью того, что геномная область биосинтеза O1-антигена

Таблица 3 / Table 3

Характеристика поверхностных антигенов выборки атипичных по признаку агглютинабельности штаммов холерных вибрионов методом ТИФА

Characteristics of surface antigens in the selected *Vibrio cholerae* strains with atypical agglutinability using ELISA

№ штамма Strain No.	Оптическая плотность, нм Optical density, nm
1317	0,128±0,002
1375	0,958±0,005
1606	1,226±0,003
77	1,28±0,01
73-RO	0,102±0,002
155	0,128±0,002
227	0,088±0,002
104	0,099±0,002
120	0,069±0,01
1-19	0,111±0,007
CA 385	0,197±0,014
548	0,181±0,004
K^+	1,298±0,006
K^-	0,094±0,003

Примечание: K^+ – положительный контроль; K^- – отрицательный контроль.

Note: K^+ – positive control; K^- – negative control.

имеется и у других «консервативных» R-штаммов, возможно, в измененной форме, что может быть предметом дальнейших молекулярно-генетических исследований по полной характеристике и анализу структуры набора генов, детерминирующих биосинтез О-антигена. В альтернативном случае штаммы с генотипом *hly⁺ctxA⁺tcpA⁺wbeT⁺wbfR⁺*, по-видимому, могут быть отнесены к *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Анализируя результаты Blast-поиска детерминант *wbe*-O1, следует отметить, что на сегодняшний день в литературе имеется всего одно сообщение об обнаружении специфичного для O1 гена *wbeN* у клинического токсигенного штамма, выделенного в Бразилии во время вспышки холеры и отнесенного к O26-серогруппе [13]. Второй такой же штамм, отнесенный к серогруппе nonO1/nonO139, не типировался и, по-видимому, представлял типичный R-вариант O1, на что указывали и результаты анализа сиквенсов межгенных участков 16S–23S рРНК. Штамм O26-серогруппы также был близок *V. cholerae* O1 и отличался от других (*wbe*-O1-негативных) штаммов O26. Возможно, что гены, определяющие O26-серотип, приобретены штаммом O1 путем генетического обмена (если здесь не имела место неспецифическая перекрестная реакция), во всяком случае, примеры серогрупповой конверсии за счет процессов трансформации либо конъюгативного переноса участков генома, кодирующих синтез О-антигена, известны и описаны в литературе [14, 15].

Анализ поверхностных структур ЛПС O1 штаммов *V. cholerae* позволил выявить штаммы с измененными (или поврежденными) структурами поверхностного антигена в диапазоне оптической плотности от (0,088±0,002) до (1,226±0,003) нм. В связи с этим мы считаем целесообразным применение в лабораторной диагностике холеры дополнительного иммунодиагностического метода (ТИФА с МКА), что имеет значение для дифференциации *V. cholerae* O1 R-варианта и *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Полученные данные могут способствовать интерпретации результатов мониторинговых исследований на холеру в лабораториях регионального и федерального уровней.

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

Список литературы

1. Mitra R.K., Nandy R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Yamasaki S., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(3):268–76. DOI: 10.1099/0022-1317-50-3-268.
2. De K., Ramamurthy T., Faruque S.M., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B., Nandy R.K. Molecular characterisation of rough strains of *Vibrio cholerae* isolated from diarrhoeal cases in India and their comparison to smooth strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 232(1):23–30. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00013-8.
3. Islam M.S., Ahsan S., Khan S.I., Ahmed Q.S., Rashid M.H., Islam K.M.N., Sack R.B. Virulence properties of rough and smooth strains of *Vibrio cholerae* O1. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48(4):229–35. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03518.x.
4. Исаев Н.Д., Лозовский Ю.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Популяционная неоднородность природных штаммов *Vibrio*

cholerae классического биовара: координированное изменение морфологии колоний, подвижности, токсигенности и ферментативных свойств. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2005; 1:43–6.

5. Черепакхина И.Я., Балахнова В.В., Подосинникова Л.С., Огнева Н.С., Сорокин В.М., Прозорова Л.А., Фецайлова О.П., Чиркова О.О. Современные подходы к изучению антигенной вариативности холерных вибрионов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 1996; 4:85–6.

6. Hisatsune K., Yamamoto T., Kondo S. Lypopolysaccharide of *Vibrio cholerae*: chemical and serological properties. In: Kuwahara S., Pierce N.F., editors. *Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas.* Tokyo; 1985. P. 17–24.

7. Chowdhury G., Bhadra R.K., Bag S., Pazhani G.P., Das B., Basu P., Nagamani K., Nandy R.K., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T. Rugose atypical *Vibrio cholerae* O1 El Tor responsible for 2009 cholera outbreak in India. *J. Med. Microbiol.* 2016; 65(10):1130–6. DOI: 10.1099/jmm.0.000344.

8. Заднова С.П., Смирнова Н.И. Роль внеклеточного экзополисахарида в адаптации возбудителя холеры во внешней среде. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2010; 3:13–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-3(105)-13-19.

9. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016; 3:5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12.

10. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Титова С.В., Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И. ГИС: возможности анализа данных фено- и генотипирования холерных вибрионов O1 серогруппы Эль Тор, изолированных из водных объектов окружающей среды на территории Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2016; 6:19–25. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-6-19-25.

11. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С. Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61(5):303–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307.

12. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.

13. Cariri F.A., Costa A.P., Melo C.C., Theophilo G.N., Hofer E., de Melo Neto O.P., Leal N.C. Characterization of potentially virulent non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strains isolated from human patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16(1):62–7. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02763.x.

14. Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6):e81. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030081.

15. Smirnova N.I., Zhuravlyova E.A., Livanova L.F., Shopyreva S.V. Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains carrying heterologous genes encoding non-O1 antigen or cholera enterotoxin. *Microb. Pathog.* 1995; 19(2):65–72. DOI: 10.1006/mpat.1995.0046.

References

1. Mitra R.K., Nandy R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Yamasaki S., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(3):268–76. DOI: 10.1099/0022-1317-50-3-268.
2. De K., Ramamurthy T., Faruque S.M., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B., Nandy R.K. Molecular characterisation of rough strains of *Vibrio cholerae* isolated from diarrhoeal cases in India and their comparison to smooth strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 232(1):23–30. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00013-8.
3. Islam M.S., Ahsan S., Khan S.I., Ahmed Q.S., Rashid M.H., Islam K.M.N., Sack R.B. Virulence properties of rough and smooth strains of *Vibrio cholerae* O1. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48(4):229–35. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03518.x.
4. Isaev N.D., Lozovsky Yu.V., Zadnova S.P., Smirnova N.I. [Population heterogeneity of natural *Vibrio cholerae* strains, classical biovar: coordinated changes in colony morphology, motility, toxigenicity and enzymatic properties]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2005; (1):43–6.
5. Cherepakina I.Ya., Balakhnova V.V., Podosinnikova L.S., Oгнева N.S., Sorokin V.M., Prozorova L.A., Fetseylova O.P., Chirkova O.O. Modern approaches to the study of antigenic variability of cholera vibrios. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1996; (4):85–6.
6. Hisatsune K., Yamamoto T., Kondo S. Lypopolysaccharide of *Vibrio cholerae*: chemical and serological properties. In: Kuwahara S., Pierce N.F., editors. *Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas.* Tokyo; 1985. P. 17–24.
7. Chowdhury G., Bhadra R.K., Bag S., Pazhani G.P., Das B., Basu P., Nagamani K., Nandy R.K., Mukhopadhyay A.K.,

Ramamurthy T. Rugose atypical *Vibrio cholerae* O1 El Tor responsible for 2009 cholera outbreak in India. *J. Med. Microbiol.* 2016; 65(10):1130–6. DOI: 10.1099/jmm.0.000344.

8. Zadnova S.P., Smirnova N.I. [The role of extracellular exopolysaccharide in cholera agent adaptation in the environment]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2010; (3):13–719. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-3(105)-13-19.

9. Gracheva I.V., Osin A.V. [Mechanisms of damaging bacteria during lyophilization and protective activity of shielding media]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (3):5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12.

10. Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Titova S.V., Arkhangel'skaya I.V., Nepomnyashchaya N.B., Ezhova M.I. [GIS: capabilities of data analysis of phenot- and genotyping of El Tor O1 serogroup cholera vibrios isolated from aquatic objects of the environment in the Russian Federation]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2016; (6):19–25. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-6-19-25.

11. Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretenchuk O.F., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Bursha O.S. [The immune-enzyme techniques of analysis in the diagnostics of cholera]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2016; 61(5):303–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307.

12. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Research]. Leningrad; 1962. 180 p.

13. Cariri F.A., Costa A.P., Melo C.C., Theophilo G.N., Hofer E., de Melo Neto O.P., Leal N.C. Characterization of potentially virulent non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strains isolated from human patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16(1):62–7. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02763.x.

14. Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6):e81. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030081.

15. Smirnova N.I., Zhuravlyova E.A., Livanova L.F., Shopyrev S.V. Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains carrying heterologous genes encoding non-O1 antigen or cholera enterotoxin. *Microb. Pathog.* 1995; 19(2):65–72. DOI: 10.1006/mpat.1995.0046.

Authors:

Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Vodop'yanov S.O., Ezhova M.I., Noskov A.K. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторах:

Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Якушева О.А., Алексеева Л.П., Водопьянов С.О., Ежова М.И., Носков А.К. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-115-119

УДК 616.98:579.841.11

Д.Н. Лучинин, Е.В. Молчанова, И.Б. Захарова, Д.В. Викторов

Анализ резистентности у *Burkholderia pseudomallei* к бензалкония хлориду и антибиотикам

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

Цель исследования – изучение особенностей формирования устойчивости к четвертично-аммонийным соединениям у *Burkholderia pseudomallei*, а также исследование ее влияния на развитие антибиотикорезистентности. **Материалы и методы.** Исследовано 10 штаммов возбудителя мелиоидоза с типичными культурально-морфологическими свойствами. Селекцию резистентных к бензалкония хлориду вариантов осуществляли путем последовательных пассажей на плотной питательной среде с добавлением дезинфектанта в повышающихся концентрациях. Определение чувствительности к бензалкония хлориду проводили методом серийных разведений в агаре, к антибактериальным препаратам из групп сульфаниламидов, β -лактамов и тетрациклинов – диско-диффузионным методом. Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с помощью компьютерной программы Microsoft Excel 2019. Вычислялись средние арифметические значения, ошибки средних величин. Достоверность различий между параметрами определялась путем расчета t-критерия Стьюдента. **Результаты и обсуждение.** Все исходные штаммы показали схожую степень устойчивости к дезинфекционному соединению и большинство – чувствительность к протестированным антибиотикам. Культивирование штаммов *B. pseudomallei* на питательной среде с добавлением бензалкония хлорида привело к повышению устойчивости к данному дезинфектанту. Помимо этого, обнаружено повышение уровня устойчивости ко всем исследованным антибиотикам. Статистическая обработка полученных данных показала значимую корреляцию между изменением чувствительности к бензалкония хлориду и появлением невосприимчивости к амоксициллину / клавулановой кислоте и цефтазидиму. Установлено, что возбудитель мелиоидоза при естественной высокой восприимчивости к бензалкония хлориду обладает высоким потенциалом развития резистентности к данному дезинфекционному средству, что имеет практическое значение при разработке режимов дезинфекции с использованием четвертично-аммонийных соединений. Впервые показана прямая корреляционная зависимость между снижением чувствительности *B. pseudomallei* к бензалкония хлориду и появлением невосприимчивости к амоксициллину / клавулановой кислоте и цефтазидиму.

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, мелиоидоз, устойчивость, бензалкония хлорид, антибиотики.

Корреспондирующий автор: Лучинин Дмитрий Николаевич, e-mail: luchinin.dmitrii@yandex.ru.

Для цитирования: Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В., Захарова И.Б., Викторов Д.В. Анализ резистентности у *Burkholderia pseudomallei* к бензалкония хлориду и антибиотикам. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 3:115–119. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-115-119
Поступила 13.05.2022. Принята к публ. 01.06.2022.

D.N. Luchinin, E.V. Molchanova, I.B. Zakharova, D.V. Viktorov

Assessment of Resistance in *Burkholderia pseudomallei* to Benzalkonium Chloride and Antibiotics

Volograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to investigate the features of resistance formation in *Burkholderia pseudomallei* to quaternary ammonium compounds, as well as to analyze its influence on the development of antibiotic resistance. **Materials and methods.** 10 strains of melioidosis causative agent with typical cultural and morphological properties have been studied. The selection of variants resistant to benzalkonium chloride was carried out by successive passages on a dense nutrient medium with the addition of a disinfectant in increasing concentrations. The determination of sensitivity to benzalkonium chloride was performed through serial dilutions in agar, to antibacterial drugs from the groups of sulfonamides, β -lactams and tetracyclines – using disk diffusion method. Statistical processing of the obtained results was conducted with the help of the Microsoft Excel 2019 software. Arithmetic mean values and errors of mean values were calculated. The significance of differences between the parameters was determined applying Student's t-test. **Results and discussion.** All parental strains showed a similar degree of resistance to the disinfectant compound and most of the strains – susceptibility to the antibiotics tested. Cultivation of *B. pseudomallei* strains on a nutrient medium with the addition of benzalkonium chloride led to an increase in resistance to this disinfectant. In addition, an increase in the level of resistance to all studied antibiotics was found. Statistical processing of the data collected revealed a significant correlation between the change in sensitivity to benzalkonium chloride and the emergence of resistance to amoxicillin/clavulanic acid and ceftazidime. It was found that the causative agent of melioidosis, with a natural high susceptibility to benzalkonium chloride, has a high potential for developing resistance to this disinfectant compound, which is of practical importance in the development of disinfection regimens using quaternary ammonium compounds. For the first time, a direct correlation between a decrease in the sensitivity to benzalkonium chloride in *B. pseudomallei* and emergence of resistance to amoxicillin/clavulonic acid and ceftazidime has been demonstrated.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, melioidosis, resistance, benzalkonium chloride, antibiotics.

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

Corresponding author: Dmitry N. Luchinin, e-mail: luchinin.dmitrii@yandex.ru.

Citation: Luchinin D.N., Molchanova E.V., Zakharova I.B., Viktorov D.V. Assessment of Resistance in *Burkholderia pseudomallei* to Benzalkonium Chloride and Antibiotics. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:115–119. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-115-119.

Received 13.05.2022. Accepted 01.06.2022.

Luchinin D.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6784-9648>
Molchanova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3722-8159>

Zakharova I.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7808-7658>
Viktorov D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2722-7948>

Мелиоидоз – опасное инфекционное заболевание, возбудителем которого является *Burkholderia pseudomallei*. Будучи сапрофитом, патоген обитает в воде и почве климатических поясов с тропическим и субтропическим климатом [1]. Мелиоидоз считается эндемичным для стран Юго-Восточной Азии, Центральной и Южной Америки, Африки, Ближнего Востока, островов Карибского архипелага, а также Австралии, Индии и Китая. По оценкам специалистов, число ежегодных случаев заболевания может достигать 165 тыс., а летальность – 60 % [2–5].

В последнее время интерес к мелиоидозу возрос в связи с регулярными заносами инфекции в страны умеренного климата больными людьми и животными. Так, спорадические случаи описаны в Великобритании, Финляндии, Германии, Франции, Италии, США и целом ряде других стран [5–9].

В настоящее время значительная часть дезинфекционных средств (ДС), разрешенных к применению на территории Российской Федерации, представляют собой композиции на основе четвертично-аммонийных соединений (ЧАС). Наряду с широким спектром противомикробного действия, данные препараты обладают достаточно низким уровнем токсичности и коррозионной активности [10]. Однако появляется все больше сведений о формировании у микроорганизмов устойчивости к ЧАС, в том числе и у представителей рода *Burkholderia* [11, 12]. Более того, для многих возбудителей инфекционных болезней определена положительная корреляционная зависимость между наличием устойчивости к дезинфектантам и антибиотикорезистентностью [13]. Исследование особенностей формирования резистентности к различным антисептическим и дезинфицирующим агентам является важным направлением в изучении *B. pseudomallei* и представляет перспективу для решения таких научно-практических задач, как подбор наиболее эффективных режимов и средств химической дезинфекции, в том числе для предупреждения формирования антибиотикорезистентности.

Таким образом, целью работы являлось изучение особенностей формирования устойчивости к ЧАС у *B. pseudomallei*, а также исследование ее влияния на развитие антибиотикорезистентности.

Материалы и методы

В работе использованы 10 штаммов возбудителя мелиоидоза: *B. pseudomallei* 1, *B. pseudomallei* 97, *B. pseudomallei* 100, *B. pseudomallei* 101, *B. pseudomallei* 114, *B. pseudomallei* 116, *B. pseudomallei* 117, *B. pseudomallei* 128, *B. pseudomallei* 134, *B. pseudo-*

mallei 60806. Все штаммы обладали типичными биохимическими, морфологическими, тинкториальными и культуральными свойствами. Культивирование проводили при температуре 37 °С в течение 18–72 часов на агаре Мюллера – Хинтона (Himedia, Индия).

В качестве ДС использовался бензалкония хлорид (БХ) (Sigma-Aldrich, США). Определение антибиотикорезистентности проводилось к основным препаратам, рекомендованным для лечения мелиоидоза [1] (цефтазидим, меропенем, триметоприм/сульфаметоксазол, амоксициллин/клавулановая кислота и доксициклин).

Чувствительность к БХ оценивали методом серийных разведений в агаре. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом.

Для селекции резистентных вариантов штаммы возбудителя пассировали на плотной питательной среде с добавлением БХ в повышающихся концентрациях. Исследуемую культуру рассевали до изолированных колоний на агаре Мюллера – Хинтона с добавлением ингибирующего агента в количестве, равном минимальной подавляющей концентрации (МПК), и инкубировали при температуре 37 °С 48–72 часа. Выросшие клоны пересевали на плотную питательную среду с добавлением дезинфектанта в возрастающей концентрации.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с помощью компьютерной программы Microsoft Excel 2019. Вычислялись средние арифметические значения, ошибки средних величин. Достоверность различий между параметрами определялась путем расчета t-критерия Стьюдента. Для проверки гипотезы о нормальном распределении полученных экспериментальных данных использовался критерий Шапиро – Уилка. Корреляционный анализ проводился с применением метода ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Определение исходной чувствительности исследованных штаммов к БХ показало наличие статистически достоверных ($p \leq 0,05$) межштаммовых отличий в уровне восприимчивости к действию ДС. Все исследованные штаммы были чувствительны к использованному антибактериальным препаратам, за исключением устойчивого к цефтазидиму *B. pseudomallei* 100 (табл. 1). Полученные значения зон задержки роста соответствуют данным антибиотикочувствительности клинических штаммов возбудителя, выделенных в эндемичных по мелиоидозу Таиланде и Малайзии [14, 15].

Таблица 1 / Table 1

Характеристика исходной чувствительности штаммов возбудителя мелиоидоза к антибактериальным соединениям

Characteristics of the initial sensitivity to antibacterial compounds in melioidosis agent strains

Штамм Strain	МПК для БХ, мкг/мл (M±m) MIC for BC, mcg/ml (M±m)	Зона задержки роста, мм (M±m) Growth inhibition zone, mm (M±m)				
		Амоксициллин / клавулановая кислота Amoxicillin / clavulanic acid	Доксициклин Doxycycline	Меропенем Meropenem	Триметоприм/ сульфаметоксазол Trimethoprim/ sulfamethoxazole	Цефтазидим Ceftazidime
<i>B. pseudomallei</i> 1	11±1,1	26,4±0,4	20,6±0,9	33,4±0,68	36,2±0,73	30,8±0,97
<i>B. pseudomallei</i> 97	32±1,0	32,2±0,9	22,2±0,7	30,0±0,71	36,8±0,37	27,8±0,73
<i>B. pseudomallei</i> 100	20,4±1,1	26±0,7	21,8±0,7	31,8±0,73	34,0±0,84	16,2±0,73
<i>B. pseudomallei</i> 101	20,4±0,4	30,4±0,8	22,0±0,5	36,0±0,63	32,4±0,51	32,4±0,68
<i>B. pseudomallei</i> 114	19,6±1,0	26,2±0,4	22,6±0,6	36,2±0,37	31,8±0,92	28,4±0,51
<i>B. pseudomallei</i> 116	20,8±1,0	26±0,6	17,6±0,6	29,8±0,49	25,8±0,80	28,8±0,80
<i>B. pseudomallei</i> 117	32,0±1,8	24±0,7	20,2±0,7	29,4±0,75	31,6±0,40	21,4±0,51
<i>B. pseudomallei</i> 128	28,2±1,3	24,8±0,7	14,4±0,7	28,0±0,55	32,2±0,37	32,0±0,71
<i>B. pseudomallei</i> 134	20,8±1,1	24,8±0,5	14,6±0,5	25,8±0,66	29,4±0,75	21,8±0,80
<i>B. pseudomallei</i> 60806	19,6±1,7	28±0,7	22,6±0,5	30,6±0,40	40,2±0,66	21,6±0,81

Примечание: МПК – минимальная подавляющая концентрация; бензалкония хлорид.

Note: MIC – minimum inhibitory concentration; BC – benzalkonium chloride.

После длительных пассажей на плотных питательных средах с добавлением ДС в повышающихся концентрациях наблюдали статистически значимое ($p \leq 0,05$) увеличение МПК бензалкония хлорида для всех штаммов от 6,2 до 19,7 раза (табл. 2, рисунок).

Способность различных видов патогенных бактерий формировать устойчивость к четвертично-аммонийным соединениям известна достаточно давно [16, 17] при наличии значительных межвидовых различий в восприимчивости, в частности, к бензалкония хлориду. Так, сальмонеллы значительно более

устойчивы к данному биоциду в сравнении с кишечной палочкой (МПК 128–256 мкг/мл и 32–64 мкг/мл соответственно) [18]. Филогенетически близкие возбудителю мелиоидоза оппортунистические буркхольдерии комплекса *B. ceracia* обладают высоким уровнем устойчивости к биоцидам группы ЧАС: показано, что средняя МПК бензалкония хлорида составляет 164 мкг/мл [19], что на порядок выше значений МПК, полученных в настоящей работе для исходных штаммов *B. pseudomallei*, – и сравнимы со значениями для пассированных штаммов.

Таблица 2 / Table 2

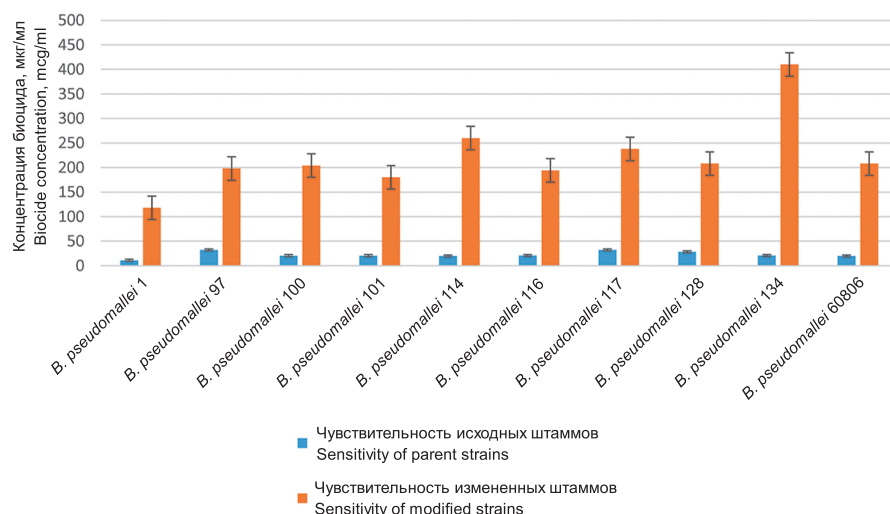
Чувствительность измененных штаммов возбудителей мелиоидоза к действию бензалкония хлорида и антибиотиков

Sensitivity to the effect of benzalkonium chloride and antibiotics in the modified strains of melioidosis agents

Штамм Strain	МПК для БХ, мкг/мл (M±m) MIC for BC, mcg/ml (M±m)	Зона задержки роста, мм (M±m) Growth inhibition zone, mm (M±m)				
		Амоксициллин / клавулановая кислота Amoxicillin / clavulanic acid	Доксициклин Doxycycline	Меропенем Meropenem	Триметоприм/ сульфаметоксазол Trimethoprim/ sulfamethoxazole	Цефтазидим Ceftazidime
<i>B. pseudomallei</i> 1	118±15,9	25,0±0,63	19,8±0,66	26,8±0,49	34,8±0,37	22,8±0,73
<i>B. pseudomallei</i> 97	198±20,6	31,4±0,40	20,0±0,32	26,0±0,71	35,4±0,51	25,6±0,93
<i>B. pseudomallei</i> 100	204±16,0	19,8±0,73	8,2±0,37	18,0±0,71	30,2±0,86	15,0±1,05
<i>B. pseudomallei</i> 101	180±15,2	28,0±0,71	14,0±0,71	19,4±0,51	32,0±0,84	25,4±1,12
<i>B. pseudomallei</i> 114	260±14,1	22,0±0,63	12,4±0,68	25,8±0,73	29,2±0,97	15,6±0,75
<i>B. pseudomallei</i> 116	194±9,3	21,6±0,51	0,4±0,24	17,4±0,51	19,6±0,98	13,4±0,60
<i>B. pseudomallei</i> 117	238±13,9	23,6±0,68	14,0±0,55	25,2±0,58	26,2±0,92	17,6±0,40
<i>B. pseudomallei</i> 128	208±12,0	23,6±0,51	13,4±0,87	25,6±0,68	26,6±0,03	22,4±0,40
<i>B. pseudomallei</i> 134	410±18,1	16,4±0,68	10,2±0,37	22,4±0,51	22,6±0,24	1,0±0,45
<i>B. pseudomallei</i> 60806	208±18,3	25,6±0,40	14,8±0,37	26,2±0,49	29,0±0,45	16,8±0,37

Примечание: МПК – минимальная подавляющая концентрация; бензалкония хлорид.

Note: MIC – minimum inhibitory concentration; BC – benzalkonium chloride.



Изменение чувствительности штаммов возбудителя мелиоидоза к действию бензалкония хлорида

Change in the sensitivity to the effect of benzalkonium chloride in melioidosis agent strains

Анализ резистентности к лекарственным препаратам штаммов с повышенной устойчивостью к бензалкония хлориду показал повышение уровня устойчивости ко всем исследованным антибиотикам: к доксициклину – в среднем на 36 %, цефтазидиму – на 33 %, меропенему – на 24 %, амоксициллину / клавулановой кислоте и триметоприму / сульфаметоксазолу – на 12 и 14 % соответственно (табл. 2). При этом два штамма (*B. pseudomallei* 100 и *B. pseudomallei* 116) приобрели полирезистентность (к доксициклину, меропенему и цефтазидиму).

Изоляты возбудителя мелиоидоза могут обладать устойчивостью к действию различных лекарственных препаратов [14, 20]. Более того, у штаммов *B. pseudomallei* возможно формирование полирезистентности из-за различных неблагоприятных факторов, таких как воздействие антибиотиков, недостаток питательных веществ [21]. Данные, полученные в настоящей работе, свидетельствуют, что воздействие четвертично-аммонийных соединений также может опосредовать развитие антибиотикорезистентности и приводить к появлению полирезистентных штаммов *B. pseudomallei*.

Для контроля стабильности приобретенной устойчивости к БХ и лекарственным препаратам полученные варианты штаммов *B. pseudomallei* подвергали последовательным пассажам (n=45) на плотных питательных средах без селективного давления. Уровни резистентности ко всем исследованным антибактериальным средствам у полученных селективных штаммов остались неизменными.

Статистическая обработка полученных экспериментальных данных показала значимую корреляцию между изменением чувствительности к БХ и появлением невосприимчивости к двум антибиотикам. Так, выявлена высокая линейная корреляционная зависимость для амоксициллина / клавулановой кислоты ($r=0,85$) и цефтазида ($r=0,86$). При этом статистически достоверной связи между повышением устойчивости к дезинфектанту и доксициклину ($r=-0,09$), меропенему ($r=-0,09$) и триметоприму/сульфаметоксазолу ($r=0,31$) не обнаружено. Полученные результаты соответствуют ранее опубликованным дан-

ным об отсутствии очевидной корреляции между устойчивостью к антибиотикам и устойчивостью к биоцидам среди бактерий комплекса *B. ceracia* [19].

Таким образом, установлено, что возбудитель мелиоидоза при естественной высокой восприимчивости к бензалкония хлориду обладает высоким потенциалом развития резистентности к данному ДС, что имеет практическое значение при разработке режимов дезинфекции с использованием ЧАС. Впервые показана прямая корреляционная зависимость между снижением чувствительности *B. pseudomallei* к бензалкония хлориду и появлением невосприимчивости к амоксициллину / клавулановой кислоте и цефтазидиму.

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

Список литературы

- Захарова И.Б., Топорков А.В., Викторов Д.В. Мелиоидоз в аспектах эпидемиологии, клиники и лабораторной диагностики. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(3):409–22. DOI: 10.15789/2220-7619-MIA-1584.
- Chakravorty A., Heath C.H. Melioidosis: An updated review. *Aust. J. Gen. Pract.* 2019; 48(5):327–32. DOI: 10.31128/AJGP-04-18-4558.
- Chewapreecha C., Holden M.T., Vehkala M., Välimäki N., Yang Z., Harris S.R., Mather A.E., Tuanyok A., De Smet B., Le Hello S., Bizet C., Mayo M., Wuthiekanun V., Limmathurotsakul D., Phetsouvanh R., Spratt B.G., Corander J., Keim P., Dougan G., Dance D.A., Currie B.J., Parkhill J., Peacock S.J. Global and regional dissemination and evolution of *Burkholderia pseudomallei*. *Nat. Microbiol.* 2017; 2:16263. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.263.
- Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.* 2016; 1(1):15008. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.
- Захарова И.Б., Топорков А.В., Викторов Д.В. Мелиоидоз и сепсис: современное состояние проблемы и актуальные вопросы эпидемиологического надзора. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 6:103–9. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-6-103-109.
- Топорков А.В., редактор. Мелиоидоз и сепсис. Волгоград: Волга-Пресс; 2016. 400 с.
- Ngauy V., Lemeshev Y., Sadkowski L., Crawford G. Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(2):970–2. DOI: 10.1128/JCM.43.2.970-972.2005.
- Berger S. Melioidosis and Glanders: Global Status. 2018 edition. GIDEON Informatics, Inc., Los Angeles, California, USA; 2018. 99 p.
- Elschner M.C., Hnizdo J., Stamm I., El-Adawy H., Mertens K., Melzer F. Isolation of the highly pathogenic and zoonotic agent *Burkholderia pseudomallei* from a pet green Iguana in Prague, Czech

Republic. *BMC Vet. Res.* 2014; 10:283. DOI: 10.1186/s12917-014-0283-7.

10. Канищев В.В., Морозов А.С., Лакомов В.П., Омеляненко С.Р., Бухаева Ю.В., Трошев Р.Г., Муравьев А.Г. Использование зарегистрированных в России дезинфицирующих средств войсками РХБ защиты в чрезвычайных ситуациях биологического характера. *Вестник войск РХБ защиты*. 2018; 2(4):57–67.

11. Health Council of the Netherlands. Resistance due to disinfectants. Background report to the advisory report *Careful use of disinfectants*. The Hague: Health Council of the Netherlands, 2016; publication No. A16/03E. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.healthcouncil.nl/binaries/healthcouncil/documenten/advisory-reports/2016/12/21/resistance-due-to-disinfectants-background-report/advisory-report-resistance-due-to-disinfectants.pdf>.

12. Ahn Y., Kim J.M., Kweon O., Kim S.J., Jones R.C., Woodling K., Gamboa da Costa G., LiPuma J.J., Hussong D., Marasa B.S., Cerniglia C.E. Intrinsic resistance of *Burkholderia cepacia* complex to benzalkonium chloride. *mBio*. 2016; 7(6):e01716-16. DOI: 10.1128/mBio.01716-16.

13. Chacón-Jiménez L., Rojas-Jiménez K. Resistencia a desinfectantes y su relación con la resistencia a los antibióticos. *Acta Médica Costarricense*. 2020; 62(1):7–12.

14. Wuthiekanun V., Amornchai P., Saiprom N., Chantratita N., Chierakul W., Koh G.C., Chaowagul W., Day N.P., Limmathurotsakul D., Peacock S.J. Survey of antimicrobial resistance in clinical *Burkholderia pseudomallei* isolates over two decades in Northeast Thailand. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(11):5388–91. DOI: 10.1128/AAC.05517-11.

15. Khosravi Y., Vellamy K.M., Mariappan V., Ng S.L., Vadivelu J. Antimicrobial susceptibility and genetic characterisation of *Burkholderia pseudomallei* isolated from Malaysian patients. *ScientificWorldJournal*. 2014; 2014:132971. DOI: 10.1155/2014/132971.

16. Сергеев В.И., Ключина Т.В., Волкова Э.О., Решетникова Н.И., Ключарева Н.М. Формирование устойчивости *Enterobacter cloacae* и *Pseudomonas aeruginosa* к дезинфектантам под воздействием бактерицидных концентраций препаратов в эксперименте. *Медицинский альманах*. 2015; 5(40):112–5.

17. Шкарин В.В., Ковалишина О.В., Благодарова А.С., Воробьева О.Н., Алексеева И.Г., Яковлева Е.И., Бугрова М.Л. Формирование устойчивости бактерий к четвертичным аммониевым соединениям в экспериментальных условиях. *Медицинский альманах*. 2012; 3(22):129–33.

18. Aarestrup F.M., Hasman H. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Vet. Microbiol.* 2004; 100(1–2):83–9. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.01.013.

19. Rose H., Baldwin A., Dowson C.G., Mahenthiralingam E. Biocide susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 63(3):502–10. DOI: 10.1093/jac/dkn540.

20. Jenney A.W., Lum G., Fisher D.A., Currie B.J. Antibiotic susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* from tropical northern Australia and implications for therapy of melioidosis. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2001; 17(2):109–13. DOI: 10.1016/S0924-8579(00)00334-4.

21. Anutrakunchai C., Bolscher J., Krom B.P., Kanthawong S., Chareonsudjai S., Taweechaisupapong S. Impact of nutritional stress on drug susceptibility and biofilm structures of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* grown in static and microfluidic systems. *PLoS One*. 2018; 13(3):e0194946. DOI: 10.1371/journal.pone.0194946.

References

1. Zakharova I.B., Toporkov A.V., Viktorov D.V. [Melioidosis in aspects of epidemiology, clinical picture and laboratory diagnostics]. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2021; 11(3):409–22. DOI: 10.15789/2220-7619-MIA-1584.

2. Chakravorty A., Heath C.H. Melioidosis: An updated review. *Aust. J. Gen. Pract.* 2019; 48(5):327–32. DOI: 10.31128/AJGP-04-18-4558.

3. Chewapreecha C., Holden M.T., Vehkala M., Välimäki N., Yang Z., Harris S.R., Mather A.E., Tuanyok A., De Smet B., Le Hello S., Bizet C., Mayo M., Wuthiekanun V., Limmathurotsakul D., Phetsouvanh R., Spratt B.G., Corander J., Keim P., Dougan G., Dance D.A., Currie B.J., Parkhill J., Peacock S.J. Global and regional dissemination and evolution of *Burkholderia pseudomallei*. *Nat. Microbiol.* 2017; 2:16263. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.263.

4. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.* 2016; 1(1):15008. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.

5. Zakharova I.B., Toporkov A.V., Viktorov D.V. [Melioidosis and glanders: the 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.

6. Toporkov A.V., editor. [Melioidosis and Glanders]. Volgograd: Volga-Press; 2016. 400 p.

7. Ngaay V., Lemeshev Y., Sadkowski L., Crawford G. Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(2):970–2. DOI: 10.1128/JCM.43.2.970-972.2005.

8. Berger S. Melioidosis and Glanders: Global Status. 2018 edition. GIDEON Informatics, Inc., Los Angeles, California, USA; 2018. 99 p.

9. Elschner M.C., Hnizdo J., Stamm I., El-Adawy H., Mertens K., Melzer F. Isolation of the highly pathogenic and zoonotic agent *Burkholderia pseudomallei* from a pet green Iguana in Prague, Czech Republic. *BMC Vet. Res.* 2014; 10:283. DOI: 10.1186/s12917-014-0283-7.

10. Kanishchev V.V., Morozov A.S., Lakomov V.P., Omel'yanenko S.R., Bukhaeva Yu.V., Troshch R.G., Murav'ev A.G. [The use of disinfectants registered in Russia by the RCB protection forces in biological emergencies]. *Vestnik Voisk Radiatsionnoi Khimicheskoi i Biologicheskoi Zashchity [Journal of RCB Protection Corps]*. 2018; 2(4):57–67.

11. Health Council of the Netherlands. Resistance due to disinfectants. Background report to the advisory report *Careful use of disinfectants*. The Hague: Health Council of the Netherlands, 2016; publication No. A16/03E. [Internet]. Available from: <https://www.healthcouncil.nl/binaries/healthcouncil/documenten/advisory-reports/2016/12/21/resistance-due-to-disinfectants-background-report/advisory-report-resistance-due-to-disinfectants.pdf>.

12. Ahn Y., Kim J.M., Kweon O., Kim S.J., Jones R.C., Woodling K., Gamboa da Costa G., LiPuma J.J., Hussong D., Marasa B.S., Cerniglia C.E. Intrinsic resistance of *Burkholderia cepacia* complex to benzalkonium chloride. *mBio*. 2016; 7(6):e01716-16. DOI: 10.1128/mBio.01716-16.

13. Chacón-Jiménez L., Rojas-Jiménez K. Resistencia a desinfectantes y su relación con la resistencia a los antibióticos. *Acta Médica Costarricense*. 2020; 62(1):7–12.

14. Wuthiekanun V., Amornchai P., Saiprom N., Chantratita N., Chierakul W., Koh G.C., Chaowagul W., Day N.P., Limmathurotsakul D., Peacock S.J. Survey of antimicrobial resistance in clinical *Burkholderia pseudomallei* isolates over two decades in Northeast Thailand. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(11):5388–91. DOI: 10.1128/AAC.05517-11.

15. Khosravi Y., Vellamy K.M., Mariappan V., Ng S.L., Vadivelu J. Antimicrobial susceptibility and genetic characterisation of *Burkholderia pseudomallei* isolated from Malaysian patients. *ScientificWorldJournal*. 2014; 2014:132971. DOI: 10.1155/2014/132971.

16. Sergeev V.I., Klyukina T.V., Volkova E.O., Reshetnikova N.I., Klyuchareva N.M. [Formation of resistance to disinfectants in *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* under the influence of bactericidal concentrations of drugs in the experiment]. *Meditsinsky Al'manakh [Medical Almanac]*. 2015; 5(40):112–5.

17. Shkarin V.V., Kovalishina O.V., Blagodarova A.S., Vorob'eva O.N., Alekseeva I.G., Yakovleva E.I., Bugrova M.L. Formation of bacterial resistance to quaternary ammonium compounds under experimental conditions. *Meditsinsky Al'manakh [Medical Almanac]*. 2012; 3(22):129–33.

18. Aarestrup F.M., Hasman H. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Vet. Microbiol.* 2004; 100(1–2):83–9. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.01.013.

19. Rose H., Baldwin A., Dowson C.G., Mahenthiralingam E. Biocide susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 63(3):502–10. DOI: 10.1093/jac/dkn540.

20. Jenney A.W., Lum G., Fisher D.A., Currie B.J. Antibiotic susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* from tropical northern Australia and implications for therapy of melioidosis. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2001; 17(2):109–13. DOI: 10.1016/S0924-8579(00)00334-4.

21. Anutrakunchai C., Bolscher J., Krom B.P., Kanthawong S., Chareonsudjai S., Taweechaisupapong S. Impact of nutritional stress on drug susceptibility and biofilm structures of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* grown in static and microfluidic systems. *PLoS One*. 2018; 13(3):e0194946. DOI: 10.1371/journal.pone.0194946.

Authors:

Luchinin D.N., Molchanova E.V., Zakharova I.B., Viktorov D.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Об авторах:

Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В., Захарова И.Б., Викторов Д.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-120-128

УДК 616.98:578.828HIV(470.11)

Ю.В. Останкова, В.С. Давыденко, А.Н. Щемелев, Е.Б. Зуева, П.А. Виrolайнен, Арег А. Тотоян

Определение тропизма ВИЧ у лиц с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»,
Санкт-Петербург, Российская Федерация

Цель работы – определение на основании анализа нуклеотидной последовательности V3-петли гена *env* тропизма ВИЧ у пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области. **Материалы и методы.** Материалом исследования служили образцы плазмы крови 76 ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии. Методом ПЦР с последующим секвенированием исследовали нуклеотидную последовательность региона C2-V3-C3 гена *env* ВИЧ. Определение генотипа исследуемых штаммов проводили на основании анализа их филогенетических отношений с референсными последовательностями из международной базы данных GenBank, а также с использованием специализированных программ. Для прогнозирования вирусного тропизма применяли правило Гарридо и биоинформатический онлайн-инструмент Geno2Pheno[coreceptor], который на основании анализа нуклеотидной последовательности V3-петли гена *env* определяет коэффициент отсека ложноположительных результатов (false positive rate – FPR). **Результаты и обсуждение.** Показана более низкая представленность R5X4/X4-тропных вариантов ВИЧ у длительное время инфицированных лиц с вирусом субсубтипа А6 по сравнению с вирусом субтипа В. Для всех алгоритмов отсека FPR наблюдали достоверную корреляцию между субтипом и тропизмом ВИЧ ($p=0,0014$ и $p=0,013$ для FPR 10 % и FPR 20 % соответственно). В то время как среди штаммов субтипа В по меньшей мере 57 % определены как R5X4/X4-тропные варианты (для FPR 10 %), в том числе два штамма отнесены к X4-тропным, среди ВИЧ субсубтипа А6 даже при FPR 20 % частота R5X4/X4-тропных образцов лишь незначительно превышала 22 %. Можно предположить, что динамика изменения тропности ВИЧ зависит от субтипа вируса. Показаны достоверные отличия распределения аминокислотных остатков последовательности V3-региона в обследуемой группе между R5-тропными и R5X4/X4-тропными штаммами субсубтипа А6 для позиций 18 ($\chi^2=7,616$, $p=0,0058$), 21 ($\chi^2=7,281$, $p=0,007$), 24 ($\chi^2=5,587$, $p=0,0181$) и 34 ($\chi^2=5,144$, $p=0,0233$). Среди R5X4/X4-тропных штаммов субсубтипа А6 представлены аминокислотные замены в позициях 6, 19, 21, 26, 29, 30, не обнаруженные у R5-тропных штаммов А6. Высокая частота встречаемости ряда мутаций, ранее описанных как связанные с устойчивостью к маравироку и подобным ему препаратам, может свидетельствовать о характерном для субсубтипа А6 естественном полиморфизме, не имеющем корреляции с резистентностью к антагонистам корцептора CCR5.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), корцепторный тропизм ВИЧ, CCR5, CXCR4, антагонисты рецептора CCR5, ген *env*, генотипическая диагностика.

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

Для цитирования: Останкова Ю.В., Давыденко В.С., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Виrolайнен П.А., Тотоян Арег А. Определение тропизма ВИЧ у лиц с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 3:120–128. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-120-128

Поступила 05.06.2022. Принята к публ. 02.09.2022.

Yu.V. Ostankova, V.S. Davydenko, A.N. Shchemelev, E.B. Zueva, P.A. Virolainen, Areg A. Totolyan

Determination of HIV Tropism in Patients with Antiretroviral Therapy Failure in Arkhangelsk Region

Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to determine the tropism of the human immunodeficiency virus in patients with virological failure of antiretroviral therapy (ART) from the Arkhangelsk Region based on the analysis of the *env* gene V3 loop nucleotide sequence. **Materials and methods.** We used blood plasma samples obtained from 76 HIV-infected persons from the Arkhangelsk Region with virological failure of antiretroviral therapy. The nucleotide sequences of the HIV *env* gene C2-V3-C3 region were studied by PCR followed by sequencing. The genotype of the studied strains was determined based on the analysis of their phylogenetic relations with reference sequences from the international GenBank database, as well as using specialized programs. To predict viral tropism, the Garrido rule and the online bioinformatic tool Geno2Pheno[coreceptor] were used. The Geno2Pheno[coreceptor] algorithm, determines the false positive rate (FPR) based on the analysis of the *env* gene V3 loop nucleotide sequence. **Results and discussion.** Significantly lower representation of R5X4/X4-tropic HIV variants in long-term infected persons with subsubtype A6 virus compared to subtype B virus has been shown. For all FPR cut-off algorithms, a significant correlation between subtype and HIV tropism was observed ($p=0.0014$ and $p=0.013$ for FPR 10 % and FPR 20 %, respectively). While among subtype B strains, at least 57 % were identified as R5X4/X4-tropic variants (for an FPR of 10 %), including two strains classified as X4-tropic; among HIV subsubtype A6 even at an FPR of 20 %, the frequency of R5X4/X4-tropic samples only slightly exceeded 22 %. It can be assumed that the dynamics of changes in HIV tropism depends on the virus subtype. Significant differences in the distribution of amino acid residues of the V3 region sequences in the examined group between R5-

tropic and R5X4/X4-tropic strains of subtype A6 for positions 18 ($\chi^2=7.616$, $p=0.0058$), 21 ($\chi^2=7.281$, $p=0.007$), 24 ($\chi^2=5.587$, $p=0.0181$), and 34 ($\chi^2=5.144$, $p=0.0233$) have been demonstrated. Among the R5X4/X4-tropic strains of the A6 subtype, amino acid substitutions were registered at positions 6, 19, 21, 26, 29, 30, which were not found in the R5-tropic A6 strains. The high occurrence frequency of a number of mutations previously described as presumably associated with resistance to maraviroc and similar drugs may indicate a natural polymorphism characteristic of the A6 subtype, which does not correlate with resistance to CCR5 co-receptor antagonists.

Key words: human immunodeficiency virus (HIV), HIV co-receptor tropism, CCR5, CXCR4, CCR5 receptor antagonists, *env* gene, genotypic diagnostics.

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

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

Citation: Ostankova Yu.V., Davydenko V.S., Shchemelev A.N., Zueva E.B., Virolainen P.A., Totolyan Areg A. Determination of HIV Tropism in Patients with Antiretroviral Therapy Failure in Arkhangelsk Region. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:120–128. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-120-128

Received 05.06.2022. Accepted 02.09.2022.

Ostankova Yu.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>
Shchemelev A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Zueva E.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>
Totolyan Areg A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

В настоящее время болезнь, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), остается глобальной проблемой здравоохранения всего мира. Программы последних лет сформулировали определяющие прогресс в диагностике и терапии цели – 90–90–90, означающие, что 90 % людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), знают о своем ВИЧ-статусе, 90 % знают свой ВИЧ-положительный статус и получают лечение и 90 % получающих лечение имеют подавленную вирусную нагрузку. Однако, согласно данным Объединенной программы ООН по ВИЧ/СПИД (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, сокращенно UNAIDS), в 2020 г. зарегистрировано 1,5 млн новых случаев инфицирования ВИЧ, а также немногим менее миллиона смертей, связанных с развитием заболевания. В целом же к 2020 г. в мире насчитывалось около 37,7 млн ЛЖВ, причем, по самым оптимистичным подсчетам, 10,2 млн из них не получали лечения [1]. Помимо проблем низкой информированности и недоступности лечения, дополнительные сложности для достижения цели 90–90–90 привносит вирусологическая неэффективность антиретровирусной терапии (АРТ), зачастую связанная с мутациями лекарственной устойчивости (ЛУ) вируса. По данным ряда исследователей, около 5 млн ЛЖВ не ответили на одну или несколько схем АРТ из-за мутаций резистентности в гене *pol*, кодирующем обратную транскриптазу, протеазу и интегразу, которые являются основными терапевтическими мишенями [2]. В настоящее время, в связи с появлением все большего количества мутаций ЛУ не только среди подвергавшихся АРТ пациентов, но и среди не получавших терапии лиц, пристальное внимание врачей обращено на возможность увеличения эффективности лечения ВИЧ-инфекции с помощью новых классов антиретровирусных препаратов (АРП), направленных на новые мишени. К таким препаратам относятся антагонисты хемокиновых рецепторов, селективно связывающиеся с корецепторами, предотвращая проникновение вируса в клетку.

Оболочка ВИЧ состоит из чередующихся константных (C1 – C5) и вариабельных (V1 – V5) регионов, обеспечивающих структурную и функцио-

нальную целостность вируса, включая функцию связывания с корецептором. Ген оболочки ВИЧ (*env*) протяженностью 2568 п.н. кодирует продукт gp160, синтезируемый в эндоплазматическом ретикулуме в виде белка-предшественника единственного полипептида, гликозилированного и собранного в олигомеры. В дальнейшем в аппарате Гольджи происходит расщепление предшественника gp160 клеточными протеазами на нековалентно связанные gp120 и gp41, кодируемые фрагментами гена *env* протяженностью 1449 п.н. и 1035 п.н. соответственно [3]. Проникновение вируса в клетки осуществляется за счет серии конформационных изменений в гомотримерном комплексе гликопротеинов вирусной оболочки gp120/gp41, опосредованных взаимодействиями с рецептором клетки CD4 и, как правило, с одним из двух корецепторов хемокинов: рецептором CC типа 5 (CCR5) или рецептором CXCR4 типа 4 (CXCR4). Соответственно, различают вирусы трех типов: обладающие тропностью к рецептору CCR5 – R5-тропные вирусы, к рецептору CXCR4 – X4-тропные вирусы и вирусы двойной тропности – R5X4 [4]. Таким образом, препаратами выбора могут быть отрицательные аллостерические модуляторы рецептора CCR5 (основной представитель класса – маравирик), которые, связываясь с корецептором, тем самым блокируют связывание с ним белка gp120 ВИЧ и последующее проникновение вируса в клетку. Очевидно при этом, что активность антагонистов ограничивается тропностью вируса и для успешного лечения с их помощью необходимо проведение анализа, позволяющего прогнозировать использование вирусными штаммами для проникновения в клетку корецептора CCR5, а не CXCR4. В дальнейшем, при широком внедрении этого класса препаратов, раннее выявление изменений тропизма вируса или мутаций устойчивости к маравирику позволит ускорить принятие решения о замене терапии и потенциально предотвратить дальнейшее накопление мутаций резистентности к другим АРП в схеме лечения.

Определение тропизма возможно как крайне дорогостоящими, долгосрочными и сложными фенотипическими методами с использованием клеточных

культур, так и более простыми генотипическими, основанными на анализе нуклеотидных последовательностей фрагментов генома вируса. Анализ ядерного магнитного резонанса показал, что петля V3 гена *env* ВИЧ протяженностью 34–36 аминокислотных остатков в положениях 296–331 штамма HXB2 демонстрирует две основные отличающиеся последовательности и конформации, соответствующие двум группам природных лигандов CCR5 и CXCR4 и отвечающие за избирательное взаимодействие с указанными корецепторами [3]. В связи с вышесказанным тропизм ВИЧ определяют преимущественно анализируя нуклеотидную последовательность гипервариабельной петли V3 в регионе поверхностного белка, кодируемого геном *env*. При этом, несмотря на высокую точность, значимым минусом фенотипических методов является их неспособность давать стабильные результаты при вирусной нагрузке ниже 1000 копий/мл, в то время как применение генотипического метода возможно даже при вирусной нагрузке менее 500 копий/мл, а в качестве матрицы допускается использование как РНК вируса, так и провирусной ДНК [4].

В Российской Федерации в 2020 г. зафиксировано более миллиона ЛЖВ с лабораторно подтвержденным диагнозом, причем встречаемость по крайней мере одной мутации ЛУ к ингибиторам ревертазы, протеазы и интегразы у терапевтически наивных лиц составила 5,5 %, а у пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ, в зависимости от региона и обследуемой группы, достигала 95 % случаев [5]. С 2012 г. в России рекомендовано применение препаратов – антагонистов рецептора CCR5 для лечения ВИЧ-инфицированных лиц с множественной резистентностью вируса к ингибиторам ревертазы, протеазы, интегразы, а также стандартизирована генотипическая методика определения тропизма вируса перед началом терапии [6]. Однако фактически препарат задействован в стандартных схемах незначительно. В том числе из-за того, что преобладающим геновариантом ВИЧ в РФ, как известно, является субтип А субсубтип А6, исследования гена *env* которого немногочисленны, несмотря на значимость типирования вирусного тропизма не только для молекулярно-генетической характеристики циркулирующего вируса, но и для прогнозирования терапевтической применимости антагонистов корецептора CCR5.

Данные о тропности вируса среди лиц с вирусологической неэффективностью АРТ в РФ ограничены, как и ограничены, соответственно, данные о возможности широкого применения новых терапевтических препаратов для лечения таких пациентов.

Цель работы – на основании анализа нуклеотидной последовательности V3-петли гена *env* определить тропизм вируса иммунодефицита человека у пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии, проживающих в Архангельской области.

Материалы и методы

В работе использованы образцы плазмы крови 76 пациентов с ВИЧ-инфекцией, жителей Архангельской области, направленные в Северо-Западный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИДом (СЗО Центр СПИД) на базе Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера в 2014–2019 гг. на определение лекарственной устойчивости вируса в связи с вирусологической неэффективностью АРТ (вирусная нагрузка >500 копий/мл после 6 месяцев АРТ или повышение вирусной нагрузки после первичного подавления репликации вируса).

Для определения нуклеотидной последовательности региона C2-V3-C3 гена *env* протяженностью около 426 нт, область 6953–7379 нт, согласно представленному в международной базе данных GenBank штамму HXB2 (K03455.1), применяли набор реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-SEQ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) согласно инструкции производителя, с использованием генетического анализатора ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США).

Первичный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA версия 7, используя алгоритм ClustalW. Оценку эволюционного расстояния между последовательностями проводили по модифицированной формуле Тамуры – Ней, для построения филогенетических деревьев и последующего анализа применяли алгоритм Neighbor-joining, позволяющий оптимизацию деревьев в соответствии с критерием «сбалансированной минимальной эволюции», при оценке достоверности филогенетических связей использовали бутстреп-анализ (bootstrap) для 1000 независимых построений каждого древа [7].

Определение генотипа исследуемых штаммов проводили на основании анализа их отношений с референсными последовательностями из международной базы данных GenBank, а также с использованием программ REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0 (<http://bpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool>) и COMET HIV-1 (<http://comet.retrovirology.lu>) [8]. Для прогнозирования вирусного тропизма использовали биоинформатический онлайн-инструмент Geno2Pheno [coreceptor] (<http://coreceptor.geno2pheno.org/index.php>), а также правило Гарридо, включающее в себя алгоритмы 11/25 и «Чистый заряд». Согласно алгоритму 11/25, штамм определяют как X4-тропный при наличии положительно заряженной аминокислоты в положениях 11 и/или 25 V3-петли. Алгоритм «Чистый заряд» характеризует штамм как X4, если общий чистый заряд аминокислотной последовательности V3-петли больше или равен 5 [9].

Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета программ MS Excel, Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc.). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. В качестве порога достоверности отличий определено значение вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Несмотря на общее ухудшение эпидемической ситуации в РФ, Архангельская область относится к территориям с низким уровнем распространения ВИЧ-инфекции. Среди зарегистрированных в регионе ВИЧ-инфицированных лиц мужчины составили 71,3 %, а женщины – 28,7 %, наибольший уровень пораженности показан в возрастной группе от 30 до 44 лет [10].

Возраст пациентов в обследуемой группе варьировал от 19 до 58 лет и составил в среднем $(37,7 \pm 7,5)$ года. Мужчин в группе достоверно больше (65,8 %; 95 % ДИ: 54,01–76,29), чем женщин (34,2 %; 95 % ДИ: 23,71–45,99). Возраст пациентов при первичном выявлении антител к ВИЧ (положительный иммуноблот) варьировал от 18 до 48 лет и составил в среднем $(31,09 \pm 8,59)$ года, отличий между женщинами $(31,29 \pm 8,94)$ года и мужчинами $(31 \pm 8,55)$ года не обнаружено. При этом у 48 % (95 % ДИ: 33,66–62,58) мужчин и 50 % (95 % ДИ: 29,93–70,07) женщин ВИЧ-инфекция впервые была выявлена в возрасте старше 30 лет, что отражает особенность эпидемии последних лет в РФ [11]. Таким образом, обследованная группа по половозрастному составу отражает популяцию ВИЧ-инфицированных больных Архангельской области.

Пациентов обследованной группы можно условно разделить на подгруппы по количеству алгоритмов для АРТ, получаемых с момента введения первой и до настоящего направления образца крови на анализ для выявления мутаций фармакорезистентности и при отсутствии ответа на лечение. В большинстве случаев (43,4 %; 95 % ДИ: 32,08–55,29) использовали одну схему АРТ, в 22,4 % (95 % ДИ: 13,6–33,38) случаев – три, по 11,8 % (95 % ДИ: 5,56–21,29) пациентов применяли две и четыре, 10,5 % (95 % ДИ: 4,66–19,69) использовали пять вариантов АРТ. При этом срок от выявления ВИЧ до начала АРТ варьировал от 0 до 12 лет и в среднем составил $(3,48 \pm 3,47)$ года, а общая протяженность терапии, включая все схемы, составляла от 1 до 13 лет, в среднем $(3,64 \pm 2,36)$ года.

Ранее на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *pol* ВИЧ определено, что в обследованной группе преобладал вирус субтипа А субсубтипа А6 (89,5 %) по сравнению с субтипом В (9,2 %), в одном случае (1,3 %) выявлен вариант CRF03_AB [12]. При филогенетическом ана-

лизе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *env* в целом отмечено сходное распределение субтипов ВИЧ в группе. Филогенетические отношения между фрагментами гена *env* исследованных штаммов ВИЧ, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ из Архангельской области, и референсными последовательностями из международной базы данных GenBank представлены на рис. 1. Для сравнения выбраны ВИЧ субтипов А1, В, С, F, CRF02_AG, CRF03_AB, а также характерные для РФ геноварианты А6 (AFSU) и BFSU, выявленные в разных городах России и странах ближнего зарубежья.

Однако образец Arch82_2017, определенный согласно анализу последовательности фрагмента гена *pol* как ВИЧ субтипа В, при анализе фрагмента гена *env* не обнаруживал достоверного сходства с изолятами кластера, включающего штаммы генотипов В и АВ (индекс поддержки узла составил 95). Тем не менее при анализе последовательности указанного штамма с использованием программ REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0 и COMET HIV-1 образец отнесен к субтипу В.

Медиана попарного генетического сходства для всех проанализированных последовательностей субсубтипа А6 составила 91,33 % (диапазон 86,33–98,33 %). Следует отметить, что среди штаммов субсубтипа А6 очевидны несколько кластеров, собранных независимо от года взятия клинического материала. В том числе несколько кластеров объединяют штаммы ВИЧ, полученные от потребителей инъекционных наркотиков. Кластеризация преимущественно сходна с таковой для фрагмента гена *pol*, отражает, по всей видимости, пути распространения вируса и демонстрирует несколько источников инфицирования, как было показано нами ранее [12].

При определении генетического тропизма штаммов ВИЧ использовали биоинформатический алгоритм Geno2pheno[coreceptor], который на основании анализа нуклеотидной последовательности V3-петли гена *env* определяет коэффициент отсеечения ложноположительных результатов (false positive rate – FPR) в диапазоне от 0 до 100 %. Данный показатель определяет риск того, что анализируемая последовательность будет неверно идентифицирована как отличная от R5, то есть низкий уровень FPR свидетельствует о высокой вероятности не-R5-тропизма исследуемого штамма. Распределение образцов по тропности осуществляли с применением отсеечения FPR на уровнях 10 и 20 %. При величине FPR менее указанного уровня образцы считали не-CCR5-тропными (R5X4 либо X4-тропными). Отметим, что FPR 10 % рекомендован Европейской консенсусной группой по клиническому ведению тестирования на тропизм ВИЧ. Однако, поскольку большинство алгоритмов разработаны преимущественно на основе данных о субтипе В и демонстрируют сравнительно низкую производительность при анализе отличных от В субтипов ВИЧ, для повышения надежности

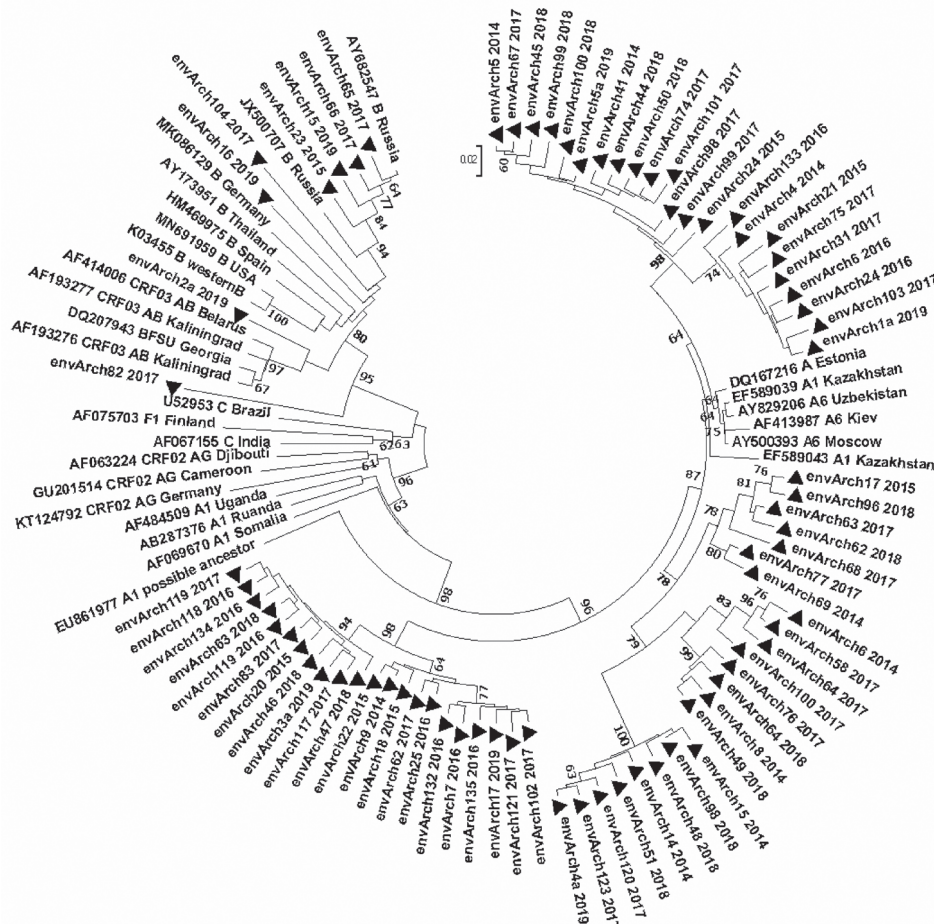


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the *env* gene fragment nucleotide sequences in the assessed HIV strains obtained from the patients with virological ART failure from the Arkhangelsk Region in comparison with the reference sequences presented in the GenBank international database. Reference sequences are designated with GenBank codes indicating the subtype and the sample origin. The samples studied in this work are designated as triangles. Bootstrap values >60

Для всех алгоритмов отсекаания FPR наблюдали достоверную корреляцию между субтипом и тропизмом ВИЧ ($p=0,0014$ и $p=0,013$ для FPR 10 % и FPR 20 % соответственно). В то время как среди штаммов субтипа В по меньшей мере 57 % определены как R5X4/X4-тропные варианты, среди ВИЧ субсубтипа А6

Distribution of HIV strains in the studied group by tropism using the Geno2pheno[coreceptor] program at different cut-off levels of false positive rate

Субтип Subtype	FPR 10 %		FPR 20 %	
	R5	R5X4/X4	R5	R5X4/X4
A6	62 (91,18 %)	6 (8,82 %)	53 (77,94 %)	15 (22,06 %)
B	3 (42,85 %)	4 (57,15 %)	1 (14,28 %)	6 (85,72 %)
CRF03_AB	1 (100 %)	0 (0 %)	1 (100 %)	0 (0 %)
χ^2 <i>p</i> value	0,0014		0,0013	
Всего Total	66 (86,84 %)	10 (13,16 %)	55 (72,37 %)	21 (27,63 %)

Согласно литературным данным, основанным на анализе ВИЧ субтипа В, было показано, что R5-тропный вирус доминирует на ранней стадии за-

болевания, но на более поздних почти у половины не получающих терапии пациентов вирус становится Х4-тропным. В связи с этим CXCR4-тропность вируса ассоциируется с прогрессией ВИЧ-инфекции, снижением уровня CD4 Т-лимфоцитов, формированием СПИДа [15, 16]. Однако дальнейшие исследования свидетельствовали, что динамика изменения тропности ВИЧ зависит от субтипа вируса. Так, например, для ВИЧ субтипа D показано преобладание варианта Х4/Р5Х4 даже на ранней стадии заболевания, тогда как ВИЧ субтипа С крайне редко оказывается Х4/Р5Х4-тропным на любой стадии заболевания [17]. Доминирование Р5-тропности вируса среди пациентов с ВИЧ субсубтипа А6 также свидетельствует о генотипспецифичности корецепторного тропизма. Отметим также, что превалирование CCR5-тропизма ранее было показано для ВИЧ субсубтипа А1 и можно бы предположить, что низкая частота встречаемости не-Р5-тропных вирусов характерна для субтипа А [18]. Однако другие исследовательские группы не находят таких отличий и сообщают о сходной частоте встречаемости Р5Х4/Х4-тропизма у находящихся на поздних стадиях заболевания пациентов с субтипами А, В, D [19]. Полученные нами результаты о распространенности у пациентов из Архангельской области Р5-тропных вариантов вируса в 72,37 % случаев в целом и в 77,94 % штаммов субсубтипа А6 согласуются с результатами сходных исследований, где показано преобладание образцов с Р5-тропными ВИЧ, например в Иркутской области (75,3 %) и других регионах России (73,9 %) [20]. На территории бывшего СССР так же показано преобладание Р5-тропности ВИЧ субсубтипа А6, независимо от стадии развития заболевания. Так, например, у пациентов Гродненского региона Республики Беларусь с ВИЧ субсубтипа А6 частота инфицированности Р5-тропным вариантом вируса превышала частоту инфицирования не-Р5-тропными, при этом не выявлено корреляции между клиническими проявлениями ВИЧ-инфекции, включая наличие СПИДа, и тропизмом вируса [21]. Напротив, исследование соотношения Р5/Х4-тропных вирусов у жителей Дальневосточного федерального округа показало преобладание Р5-тропизма у терапевтически наивных лиц и значительное увеличение Х4-тропизма ВИЧ у пациентов с длительной историей лечения [22].

Таким образом, в целом полученный в настоящей работе показатель высокой распространенности CCR5-тропных вирусов субсубтипа А6 у ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологической неэффективностью АРТ в Архангельской области совпадает с таковым в других регионах Российской Федерации, в то время как противоречащие данные связаны, по всей видимости, с особенностями обследованных групп.

Анализируя распространенность мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ среди пациентов с вирусологически неэффективной АРТ в Архангельской области, мы сообщали, что частота встречаемости ЛУ в группе составила 86,8 %, в том

числе к ингибиторам протеазы – 33,3 %, к ингибиторам ревертазы – 92,4 % [12]. Распространенность не-Р5-тропного вируса в группе не коррелировала с указанными мутациями ЛУ. Таким образом, для большинства обследованных лиц терапия с использованием антагонистов корецептора CCR5 может быть потенциально успешным вариантом выбора АРТ.

Казалось бы очевидным, что выявление CXCR4-тропного варианта ВИЧ при неэффективности лечения антагонистами корецептора CCR5 обусловлено исходным его наличием и проведение теста для исключения присутствия Х4-вируса до назначения препаратов позволит оптимизировать терапию. Однако некоторые исследования указывают на недостаточность определения нуклеотидной последовательности V3-петли гена *env* ВИЧ субсубтипа А6 для достоверного подтверждения потенциальной эффективности лечения. Устойчивость вируса к антагонистам корецептора CCR5 может быть следствием не только Р5Х4/Х4-тропизма, но и появления мутаций устойчивости к препаратам типа маравириков, несмотря на отсутствие конверсии CCR5-тропного штамма в CXCR4-тропный [23]. Причем указанные мутации выявляли как у не получавших лечения больных, так и у лиц на АРТ. Штаммы с мутациями устойчивости к маравирику способны связываться с изменившим свою конформацию за счет взаимодействия с препаратом рецептором CCR5 со сниженным уровнем сродства, однако это не позволяет полностью ингибировать вирус даже при увеличении концентрации АРП.

Так, показано, что, помимо замен в положениях 11 и 25 аминокислотной последовательности V3-петли, влияние на чувствительность к антагонистам корецептора CCR5 демонстрируют замены на тирозин в положениях 5 и 7 (5Y, 7Y). В десятку наиболее потенциально значимых мутаций вошли также замены в позициях 13, 18, 22 и 24, не исключено влияние мутаций в позициях 3, 13, 20 и 32 [14]. Проведена оценка распределения встречаемости аминокислотных остатков последовательности V3-региона в обследуемой группе (рис. 2).

Показаны достоверные отличия между Р5-тропными и Р5Х4/Х4-тропными штаммами субсубтипа А6 для позиций 18 ($\chi^2=7,616$, $p=0,0058$), 21 ($\chi^2=7,281$, $p=0,007$), 24 ($\chi^2=5,587$, $p=0,0181$), 34 ($\chi^2=5,144$, $p=0,0233$). Среди Р5Х4/Х4-тропных штаммов субсубтипа А6 представлены аминокислотные замены в позициях 6, 19, 21, 26, 29, 30, не обнаруженные у Р5-тропных штаммов А6. Причем в позициях 6 и 21 появились положительно заряженные аминокислоты К и Н соответственно. Кроме того, наблюдалась тенденция к повышенной встречаемости сходных замен в позициях 10, 18, 32 и 34. Отметим, что ранее показано: среди устойчивых к маравирику Р5-тропных штаммов наиболее часты замены в позициях 10, 13, 14, 18 и 25. Наиболее распространенными заменами в этих положениях были 10R, 13H/P,

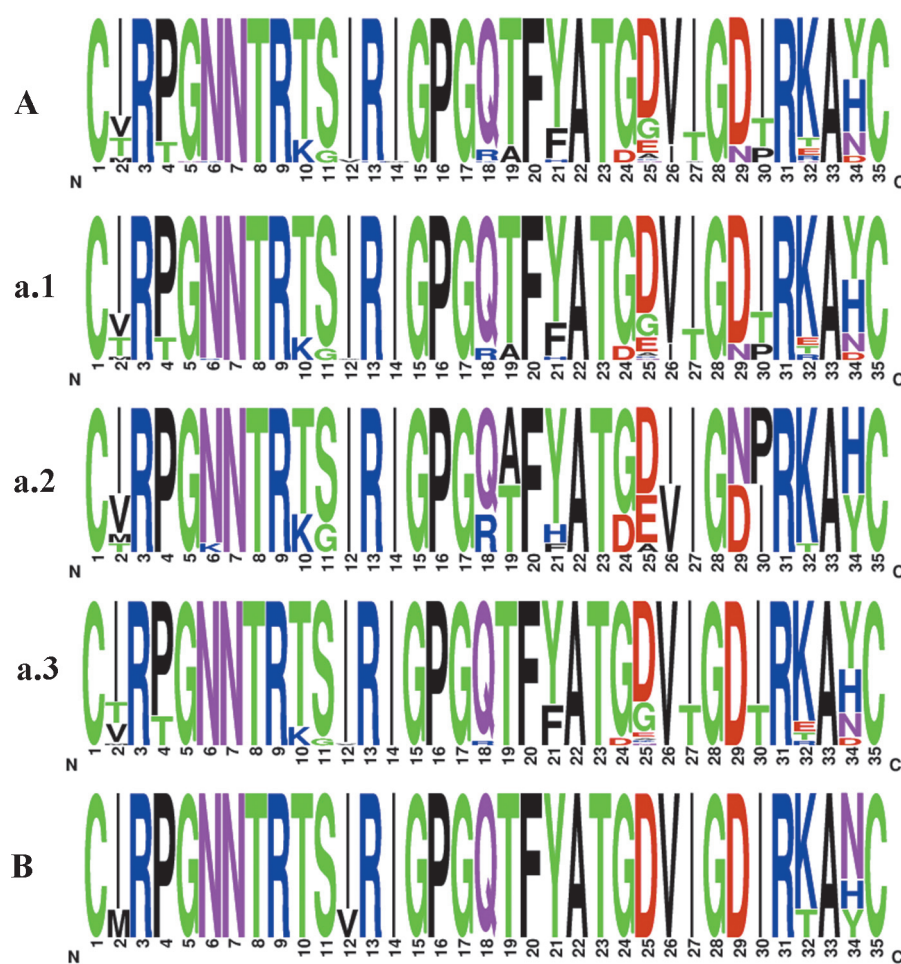


Рис. 2. Относительные частоты появления каждого аминокислотного основания в последовательности V3-петли:

Аминокислоты окрашены в соответствии с их химическими свойствами: полярные (G, S, T, Y, C, Q, N) – зеленые; основные (K, R, H) – синие; кислые (D, E) – красные; гидрофобные (A, V, L, I, P, W, F, M) – черные. *A* – все штаммы; *a.1* – все штаммы субсубтипа A6; *a.2* – R5X4/X4-тропные штаммы субсубтипа A6; *a.3* – R5-тропные штаммы субсубтипа A6; *B* – штаммы субтипа B

Fig. 2. The relative frequencies of each amino acid base occurrence in the V3 loop sequence:

Amino acids are colored according to their chemical properties: polar amino acids (G, S, T, Y, C, Q, N) are green; basic (K, R, H) – blue; acidic (D, E) – red, and hydrophobic (A, V, L, I, P, W, F, M) amino acids are black. *A* – all strains; *a.1* – all strains of subtype A6; *a.2* – R5X4/X4-tropic strains of subtype A6; *a.3* – R5-tropic strains of subtype A6; *B* – strains of subtype B

14I/M, 18R и 25D, часть из которых показана и в нашем исследовании. Однако распространенность этих замен среди устойчивой к антагонистам рецептора CCR5 популяции сравнительно низка (от 9 до 16 %), в зависимости от замены [14]. В обследованной группе в положении 14 во всех исследованных последовательностях представлен изолейцин, а вариант 25D представлен как у R5X4/X4-тропных штаммов, так и у большинства R5-тропных. Кроме того, не выявлены случаи 13H/P, не представлены замены 10R. Однако у 13,5 % R5-тропных штаммов и 26,67 % R5X4/X4-тропных штаммов показаны замены 10K. Замена 18R также представлена у 26,67 % R5X4/X4-тропных штаммов и только у 3,77 % R5-тропных. В то же время, учитывая, что в обследованной группе представлены пациенты, не принимавшие ранее антагонисты CCR5, замены в указанных положениях могут являться характерными для субсубтипа A6 естественными полиморфными вариантами, не связанными с устойчивостью к маравироку и подобным ему препаратам. Это согласуется с результатами M.E. Lewis *et al.*, согласно которым обследованные ими штаммы субсубтипа A6 содержали в V3-регионе несколько аминокислот, ранее описанных как связанные с устойчивостью к маравироку (11S, 20F, 25D, 26V) и, несмотря на это, фенотипически чувствительных к маравироку [24]. Дополнительным подтверждением предположения

может являться исследование, посвященное влиянию на тропизм ВИЧ не только V3-петли, но и вариабельных регионов V1, V2 и V4 [25].

Таким образом, выявление отдельных мутаций предсказанной аминокислотной последовательности V3-региона имеет больше фундаментально научное, чем прикладное, значение. Однако генотипическое определение вирусного тропизма вкпе с анамнестическими данными и анализом нуклеотидной последовательности более широкого региона гена *env* может способствовать прогностической оценке исхода терапии.

Полученные и проанализированные нуклеотидные последовательности C2-V3-C3 участка гена *env* 76 штаммов ВИЧ депонированы в международную базу данных GeneBank под номерами OM240730 – OM240805.

Полученные результаты подтверждают преимущественное изменение тропности ВИЧ с R5 на R5X4/X4 с течением времени у вирусов субтипа B среди пациентов с вирусологически неэффективной антиретровирусной терапией. Впервые показана значительно более низкая представленность R5X4/X4-тропных вариантов ВИЧ у длительное время инфицированных лиц с вирусом субсубтипа A6 по сравнению вирусом субтипа B в Архангельской области. Можно предположить, что динамика изменения тропности ВИЧ зависит от субтипа вируса.

Высокая частота встречаемости ряда мутаций, ранее описанных как предположительно связанные с устойчивостью к маравироку и подобным ему препаратам, может свидетельствовать о характерном для субтипа А6 естественном полиморфизме, не имеющем корреляции с резистентностью к антагонистам корцептора CCR5.

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

Список литературы

1. UNAIDS data 2021. [Электронный ресурс]. URL: https://www.unaids.org/en/resources/documents/2021/2021_unaids_data (дата обращения 31.05.2022).
2. Rhee S.Y., Kassaye S.G., Jordan M.R., Kouamou V., Katzenstein D., Shafer R.W. Public availability of HIV-1 drug resistance sequence and treatment data: a systematic review. *Lancet Microbe*. 2022; 3(5):e392-e398. DOI: 10.1016/S2666-5247(21)00250-0.
3. Aiamkitsumrit B., Dampier W., Antell G., Rivera N., Martin-Garcia J., Pirrone V., Nonnemacher M.R., Wigdahl B. Bioinformatic analysis of HIV-1 entry and pathogenesis. *Curr. HIV Res.* 2014; 12(2):132–61. DOI: 10.2174/1570162x12666140526121746.
4. Riemenschneider M., Cashin K.Y., Budeus B., Sierra S., Shirvani-Dastgerdi E., Bayanolhagh S., Kaiser R., Gorry P.R., Heider D. Genotypic prediction of co-receptor tropism of HIV-1 subtypes A and C. *Sci. Rep.* 2016; 6:24883. DOI: 10.1038/srep24883.
5. Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э., Семенова Д.А., Давыденко В.С., Тотолан А.А. Генетическое разнообразие и мутации лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в Ленинградской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022; 99(1):28–37. DOI: 10.36233/0372-9311-216.
6. Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., Поляков А.Н., Букин Е.К., Kaiser R., Luebke N., Кувейда Д.А., Шипулин Г.А. Первый опыт применения стандартизированной генотипической методики определения тропизма ВИЧ. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 6:46–8.
7. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7):1870–4. DOI: 10.1093/molbev/msw054.
8. Struck D., Lawyer G., Ternes A.-M., Schmit J.-C., Bercoff D.P. COMET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(18):e144. DOI: 10.1093/nar/gku739.
9. Seclén E., Garrido C., González M.M., González-Lahoz J., de Mendoza C., Soriano V., Poveda E. High sensitivity of specific genotypic tools for detection of X4 variants in antiretroviral-experienced patients suitable to be treated with CCR5 antagonists. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65(7):1486–92. DOI: 10.1093/jac/dkq137.
10. Попова Е.С., Сорокина Т.А. Информационный бюллетень центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями Государственного автономного учреждения здравоохранения Архангельской области «Архангельский клинический кожно-венерологический диспансер». 2018. №1(38). [Электронный ресурс]. URL: http://www.kotlasgb.ru/for_patients/proflact/2017%20%D0%BE%D0%B4%20%D0%98%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%20%D0%B1%D1%8E%D0%BB%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%B5%D0%BD%D1%8C.doc (дата обращения 04.06.2022).
11. Бобкова М.Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ. М.: Человек; 2014. 288 с.
12. Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Чурина М.А., Валутите Д.Э., Семенов А.В. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ у пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2019; 11(4):79–90. DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90.
13. Martínez-Montesinos Y., Kouri-Cordellá V., Pérez-Santos L., Han R., Pintos-Saavedra Y., Alemán-Campos Y., Soto-Brito Y., Baños-Morales Y., Caturla-Fernández Y. Subtype-dependent co-receptor tropism in Cuban HIV-1-infected patients: implications for maraviroc treatment. *MEDICC Rev.* 2021; 23(3-4):29–36. DOI: 10.37757/MR2021.V23.N3.6.
14. Chen X., Wang Z.X., Pan X.M. HIV-1 tropism prediction by the XGboost and HMM methods. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):9997. DOI: 10.1038/s41598-019-46420-4.
15. Archer J., Braverman M.S., Taillon B.E., Desany B., James I., Harrigan P.R., Lewis M., Robertson D.L. Detection of low-fre-

quency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *AIDS*. 2009; 23(10):1209–18. DOI: 10.1097/QAD.0b013e3283282b4399.

16. Brumme Z.L., Goodrich J., Mayer H.B., Brumme C.J., Henrick B.M., Wynhoven B., Asselin J.J., Cheung P.K., Hogg R.S., Montaner J.S., Harrigan P.R. Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naïve individuals. *J. Infect. Dis.* 2005; 192(3):466–74. DOI: 10.1086/431519.

17. Schuitemaker H., Van't Wout A. B., Lusso P. Clinical significance of HIV-1 coreceptor usage. *J. Transl. Med.* 2011; 9 (Suppl 1):S5. DOI: 10.1186/1479-5876-9-S1-S5.

18. Nyamache A.K., Muigai A.W., Ng'ang'a Z., Khamadi S.A. Profile of HIV type 1 coreceptor tropism among Kenyan patients from 2009 to 2010. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2013; 29(8):1105–9. DOI: 10.1089/aid.2012.0284.

19. Esbjörnsson J., Månsson F., Martínez-Arias W., Vincic E., Biague A.J., da Silva Z.J., Fenyö E.M., Norrgren H., Medstrand P. Frequent CXCR4 tropism of HIV-1 subtype A and CRF02_AG during late-stage disease – indication of an evolving epidemic in West Africa. *Retrovirology*. 2010; 7:23. DOI: 10.1186/1742-4690-7-23.

20. Лебедев А.В., Нешумаев Д.А., Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Туманов А.С., Глушенко Н.В., Плотникова Ю.К., Пономарева О.А., Ярыгина Е.И., Бобкова М.Р. Сравнительный анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в Иркутской области в 1999 и 2012 гг. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(3):112–8. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-112-118.

21. Матиевская Н.В., Киреев Д.Е., Дмитрикова М.Ю., Токунова И.О., Кондратович И.А. Клинико-иммунологические и эпидемиологические особенности ВИЧ-инфекции в зависимости от тропизма ВИЧ-1. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2015; 7(1):52–9.

22. Котова В.О., Балахонцева Л.А., Янович О.А., Липская Н.А., Ломкина Е.А., Герц А.Г., Давудова И.В., Кузьменко Е.В., Кожевников А.А., Троценко О.Е. Результаты исследования тропизма ВИЧ-1 у ВИЧ-инфицированных Дальневосточного федерального округа Российской Федерации. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2015; 28:61–6.

23. Васильев А.В., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. Анализ распространенности мутаций устойчивости к препаратам-антагонистам корцептора CCR5 среди вариантов ВИЧ-1 в России. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(3):32–7.

24. Lewis M.E., Jubb B., Simpson P., Lopatukhin A., Kireev D., Bobkova M., Craig C., van der Ryst E., Westby M., Butler S.L. Highly prevalent Russian HIV-1 V3-loop sequence variants are susceptible to maraviroc. *Antivir. Chem. Chemother.* 2021; 29:20402066211025156. DOI: 10.1177/20402066211025156.

25. Kitawi R.C., Hunja C.W., Aman R., Ogutu B.R., Muigai A.W., Kokwaro G.O., Ochieng W. Partial HIV C2V3 envelope sequence analysis reveals association of coreceptor tropism, envelope glycosylation and viral genotypic variability among Kenyan patients on HAART. *Viol. J.* 2017; 14(1):29. DOI: 10.1186/s12985-017-0703-y.

References

1. UNAIDS data 2021. data (Cited 31 May 2022). [Internet]. Available from https://www.unaids.org/en/resources/documents/2021/2021_unaids_data.
2. Rhee S.Y., Kassaye S.G., Jordan M.R., Kouamou V., Katzenstein D., Shafer R.W. Public availability of HIV-1 drug resistance sequence and treatment data: a systematic review. *Lancet Microbe*. 2022; 3(5):e392-e398. DOI: 10.1016/S2666-5247(21)00250-0.
3. Aiamkitsumrit B., Dampier W., Antell G., Rivera N., Martin-Garcia J., Pirrone V., Nonnemacher M.R., Wigdahl B. Bioinformatic analysis of HIV-1 entry and pathogenesis. *Curr. HIV Res.* 2014; 12(2):132–61. DOI: 10.2174/1570162x12666140526121746.
4. Riemenschneider M., Cashin K.Y., Budeus B., Sierra S., Shirvani-Dastgerdi E., Bayanolhagh S., Kaiser R., Gorry P.R., Heider D. Genotypic prediction of co-receptor tropism of HIV-1 subtypes A and C. *Sci. Rep.* 2016; 6:24883. DOI: 10.1038/srep24883.
5. Shchemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Semenova D.A., Davыdenko V.S., Totolany A.A. [Genetic diversity and drug resistance mutations of HIV-1 in the Leningrad Region]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2022; 99(1):28–37. DOI: 10.36233/0372-9311-216.
6. Lopatukhin A.E., Kireev D.E., Polyakov A.N., Bukin E.K., Kaiser R., Luebke N., Kuevda D.A., Shipulin G.A. [The first experience of using a standardized genotypic method for determining HIV tropism]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2013; 6:46–8.
7. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7):1870–4. DOI: 10.1093/molbev/msw054.

8. Struck D., Lawyer G., Ternes A.-M., Schmit J.-C., Bercoff D.P. COMET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(18):e144. DOI: 10.1093/nar/gku739.
9. Seclén E., Garrido C., González M.M., González-Lahoz J., de Mendoza C., Soriano V., Poveda E. High sensitivity of specific genotypic tools for detection of X4 variants in antiretroviral-experienced patients suitable to be treated with CCR5 antagonists. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65(7):1486–92. DOI: 10.1093/jac/dkq137.
10. Popova E.S., Sorokina T.A. [Information bulletin of the Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases of the State Autonomous Healthcare Institution of the Arkhangelsk Region “Arkhangelsk Clinical Dermatovenerological Dispensary”. Arkhangelsk]. 2018. No. 1(38). (Cited 04 Jun 2022). [Internet]. Available from: http://www.kotlasgb.ru/for_patients/pr_ofilact/2017%20%D0%B3%D0%BE%D0%B4%20%D0%98%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%20%D0%B1%D1%8E%D0%BB%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%B5%D0%BD%D1%8C.doc.
11. Bobkova M.R. [Drug Resistance of HIV]. Moscow: Chelovek; 2014. 288 p.
12. Ostankova Yu.V., Shchemelev A.N., Zueva E.V., Churina M.A., Valutite D.E., Semenov A.V. [HIV molecular epidemiology and pharmaco-resistance in patients with antiretroviral therapy failure in Arkhangelsk Region]. *VICH Infektsiya i Immunosupressii [HIV Infection and Immunosuppressive Disorders]*. 2019; 11(4):79–90. DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90.
13. Martínez-Montesinos Y., Kouri-Cordellá V., Pérez-Santos L., Han R., Pintos-Saavedra Y., Alemán-Campos Y., Soto-Brito Y., Baños-Morales Y., Caturra-Fernández Y. Subtype-dependent coreceptor tropism in Cuban HIV-1-infected patients: implications for maraviroc treatment. *MEDICC Rev.* 2021; 23(3-4):29–36. DOI: 10.37757/MR2021.V23.N3.6.
14. Chen X., Wang Z.X., Pan X.M. HIV-1 tropism prediction by the XGboost and HMM methods. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):9997. DOI: 10.1038/s41598-019-46420-4.
15. Archer J., Braverman M.S., Taillon B.E., Desany B., James I., Harrigan P.R., Lewis M., Robertson D.L. Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *AIDS.* 2009; 23(10):1209–18. DOI: 10.1097/QAD.0b013e32832b4399.
16. Brumme Z.L., Goodrich J., Mayer H.B., Brumme C.J., Henrick B.M., Wynhoven B., Asselin J.J., Cheung P.K., Hogg R.S., Montaner J.S., Harrigan P.R. Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naïve individuals. *J. Infect. Dis.* 2005; 192(3):466–74. DOI: 10.1086/431519.
17. Schuitemaker H., Van't Wout A. B., Lusso P. Clinical significance of HIV-1 coreceptor usage. *J. Transl. Med.* 2011; 9 (Suppl 1):S5. DOI: 10.1186/1479-5876-9-S1-S5.
18. Nyamache A.K., Muigai A.W.T., Ng'ang'a Z., Khamadi S.A. Profile of HIV type 1 coreceptor tropism among Kenyan patients from 2009 to 2010. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2013; 29(8):1105–9. DOI: 10.1089/aid.2012.0284.
19. Esbjörnsson J., Månsson F., Martínez-Arias W., Vincic E., Biague A.J., da Silva Z.J., Fenyö E.M., Norrgren H., Medstrand P. Frequent CXCR4 tropism of HIV-1 subtype A and CRF02_AG during late-stage disease – indication of an evolving epidemic in West Africa. *Retrovirology.* 2010; 7:23. DOI: 10.1186/1742-4690-7-23.
20. Lebedev A.V., Neshumayev D.A., Kazennova E.V., Lapovok I.A., Laga V.Yu., Tumanov A.S., Glushchenko N.V., Plotnikova Yu.K., Ponomareva O.A., Yarygina E.I., Bobkova M.R. [Comparative analysis of genetic variants of the HIV-1 circulating in the Irkutsk Region in 1999 and 2012]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2016; 61(3):112–8. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-112-118.
21. Matievskaya N.V., Kireev D.E., Dmitriyukova M.Yu., Tokunova I.O., Kondratovich I.A. [Clinical, immunological and epidemiological features of HIV infection depending upon HIV-1 tropism]. *VICH Infektsiya i Immunosupressii [HIV Infection and Immunosuppressive Disorders]*. 2015; 7(1):52–9.
22. Kotova V.O., Balakhontseva L.A., Yanovich O.A., Lipskaya N.A., Lomakina E.A., Gerets A.G., Davudova I.V., Kuz'menko E.V., Kozhevnikov A.A., Trotsenko O.E. [Results of investigation of HIV-1 tropism in HIV-infected patients on the territory of Far Eastern Federal District]. *Dal'nevostochny Zhurnal Infektsionnoi Patologii [Far Eastern Journal of Infectious Pathology]*. 2015; (28):61–6.
23. Vasil'ev A.V., Kazennova E.V., Bobkova M.R. [Analysis of the prevalence of CCR5 co-receptor antagonist resistance mutations among HIV-1 variants in Russia]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2011; 56(3):32–7.
24. Lewis M.E., Jubb B., Simpson P., Lopatukhin A., Kireev D., Bobkova M., Craig C., van der Ryst E., Westby M., Butler S.L. Highly prevalent Russian HIV-1 V3-loop sequence variants are susceptible to maraviroc. *Antivir. Chem. Chemother.* 2021; 29:20402066211025156. DOI: 10.1177/20402066211025156.
25. Kitawi R.C., Hunja C.W., Aman R., Ogutu B.R., Muigai A.W., Kokwaro G.O., Ochieng W. Partial HIV C2V3 envelope sequence analysis reveals association of coreceptor tropism, envelope glycosylation and viral genotypic variability among Kenyan patients on HAART. *Virology.* 2017; 14(1):29. DOI: 10.1186/s12985-017-0703-y.

Authors:

Ostankova Yu.V., Davydenko V.S., Shchemelev A.N., Zueva E.B., Virolainen P.A., Totolyan Areg A. Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 14, Mira St., St. Petersburg, 197101, Russian Federation. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Об авторах:

Останкова Ю.В., Давыденко В.С., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Виrolainen П.А., 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.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-129-136

УДК 616.98:579.852.11(470.41)

Т.А. Савицкая¹, В.А. Трифонов^{1,2}, И.В. Милова³, Г.Ш. Исаева^{1,4}, И.Д. Решетникова^{1,5}, И.В. Серова¹,
Д.В. Лопушов², В.Б. Зиятдинов¹

Сибирская язва в Республике Татарстан (1920–2020 гг.)

¹ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии», Казань, Российская Федерация;
Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Казань, Российская Федерация;
³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)», Казань, Российская Федерация;
⁴ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Казань, Российская Федерация; ⁵Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация

Целью работы являлась характеристика эпидемиологической и эпизоотической ситуации по сибирской язве среди людей и животных в Республике Татарстан в период 1920–2020 гг. **Материалы и методы.** Анализ эпидемиологической и эпизоотической ситуации за период 1920–2020 гг. основан на архивных данных, эпидемиологических картах заболевших сибирской язвой, результатах эпизоотолого-эпидемиологического обследования очагов сибирской язвы Управлением Роспотребнадзора по Республике Татарстан и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан», материалах Главного управления ветеринарии Республики Татарстан. Микробиологические исследования проб от больных и из объектов окружающей среды проводили в соответствии с требованиями МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы», для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали тест-систему «АмплиСенс *Bacillus anthracis*-FRT» (ЦНИИЭ, Москва). Статистическая обработка данных проводилась с помощью метода квантильного ранжирования. **Результаты и обсуждение.** В Республике Татарстан, относящейся к Приволжскому федеральному округу, располагаются более 1000 сибиреязвенных почвенных очагов. Анализ эпизоотолого-эпидемиологической ситуации в Республике Татарстан за период 1920–2020 гг. показал, что она претерпела значительные изменения: от массовых заболеваний животных и людей в начале XX в. до единичных случаев инфекции среди людей и животных в начале XXI в. – прежде всего за счет профилактических ветеринарно-санитарных мероприятий, включающих в себя ветеринарно-санитарную экспертизу продуктов животноводства, массовую специфическую иммунизацию животных против сибирской язвы, обустройство сибиреязвенных скотомогильников. В связи с улучшением эпизоотологической обстановки и проведением профилактических мероприятий произошло снижение заболеваемости сибирской язвой среди людей. Проведено ранжирование районов республики по количеству случаев заболеваний животных сибирской язвой.

Ключевые слова: сибирская язва, эпидемиологическая ситуация, сибиреязвенные скотомогильники, почвенные очаги.

Корреспондирующий автор: Савицкая Татьяна Александровна, e-mail: tatasav777@mail.ru.

Для цитирования: Савицкая Т.А., Трифонов В.А., Милова И.В., Исаева Г.Ш., Решетникова И.Д., Серова И.В., Лопушов Д.В., Зиятдинов В.Б. Сибирская язва в Республике Татарстан (1920–2020 гг.). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:129–136. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-129-136

Поступила 04.02.2021. Отправлена на доработку 25.10.2021. Принята к публ. 28.06.2022.

T.A. Savitskaya¹, V.A. Trifonov^{1,2}, I.V. Milova³, G.Sh. Isaeva^{1,4}, I.D. Reshetnikova^{1,5}, I.V. Serova¹,
D.V. Lopushov², V.B. Ziatdinov¹

Anthrax in the Republic of Tatarstan (1920–2020)

¹Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation;

²Kazan State Medical Academy – Affiliated Branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Ministry of Health of Russia, Kazan, Russian Federation;

³Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan, Kazan, Russian Federation;

⁴Kazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kazan, Russian Federation;

⁵Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to characterize the epidemiological and epizootic situation on anthrax among population and animals in the Republic of Tatarstan over a period of 1920–2020. **Materials and methods.** The analysis of the epidemiological and epizootic situation is based on the archival data, epidemiological maps of anthrax patients, results of epizootiological-epidemiological survey of anthrax foci conducted by the Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Tatarstan and Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan, materials of the Main Directorate of Veterinary Medicine of the Republic of Tatarstan. Microbiological studies of samples from patients and environmental objects were performed in accordance with the requirements of MR 4.2.2413-08 “Laboratory diagnostics and detection of anthrax pathogen”, real-time PCR was set using the AmpliSense *Bacillus anthracis*-FRT test-system (Central Research Institute of Epidemiology, Moscow). Statistical data processing was carried out using the quantile ranking method. **Results and discussion.** There are more than 1000 anthrax soil foci in the Republic of Tatarstan, which territorially belongs to the Volga Federal District. Analysis of the epizootic and epidemiological situation in the Republic of Tatarstan over the period of 1920–2020 has revealed that it has undergone significant changes, from mass diseases in animals and humans in early 20th century to sporadic cases of infection among population and animals at the beginning of the 21st century, primarily due to preventive veterinary- sanitary measures, including veterinary and sanitary exami-

nation of animal products, mass specific immunization of animals against anthrax, arrangement of anthrax cattle burial grounds. In view of the improvement of epizootiological situation and implementation of preventive measures, there was a decrease in the incidence of anthrax among the population. The regions of the Republic have been ranked by the number of animal anthrax cases.

Key words: anthrax, epidemiological situation, anthrax cattle burial grounds, soil foci.

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

Corresponding author: Tatiana A. Savitskaya, e-mail: tatasav777@mail.ru.

Citation: Savitskaya T.A., Trifonov V.A., Milova I.V., Isaeva G.Sh., Reshetnikova I.D., Serova I.V., Lopushov D.V., Ziatdinov V.B. Anthrax in the Republic of Tatarstan (1920–2020). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:129–136. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-129-136

Received 04.02.2021. **Revised** 25.10.2021. **Accepted** 28.06.2022.

Savitskaya T.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6229-0387>

Trifonov V.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8374-6024>

Milova I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0181-6864>

Isaeva G.Sh., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1462-8734>

Reshetnikova I.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2600-7414>

Serova I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7178-9609>

Lopushov D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8896-969X>

Ziatdinov V.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8029-6515>

Сибирская язва – опасная инфекция, вызываемая спорообразующими микроорганизмами, которые способны сохраняться в почве долгие годы, образуя стойкие природные очаги. Несмотря на значительные успехи в борьбе с этой болезнью, сибирская язва продолжает регистрироваться во многих странах Африки, Азии, Южной Америки [1, 2]. Крупные вспышки сибирской язви как среди животных, так и среди людей происходят ежегодно в странах Африки. Так, в Уганде в 2017 г. кишечной формой сибирской язви заболели 40 человек [3]. В 2016 г. произошла крупная вспышка сибирской язви среди северных оленей на полуострове Ямал в Сибири [4]. В странах, расположенных в непосредственной близости от границ Российской Федерации, эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация также остается напряженной. Так, в КНР в 2016 г. в округе Чжицзинь (провинция Гуйчжоу) регистрировалась кожная форма сибирской язви среди людей [5]. В Киргизии за период 2005–2015 гг. зарегистрировано 234 случая сибирской язви. Заражение сибирской язвой происходило в результате прямого контакта людей с сельскохозяйственными животными (СХЖ), при убое скота, разделке и продаже мяса [6]. Кроме того, в 2018 г. в Киргизии отмечены две вспышки, заболели 26 человек, а в 2019 г. – 2 [7]. В Армении в 2019 г. сибирской язвой заболели 9 человек [8], в Азербайджане – 3 [9], в Казахстане – 8 [10–11]. В Беларуси (в Брестской области) выявлен один случай сибирской язви у лошади [12], а в Таджикистане – 2 случая у крупного рогатого скота (КРС) [2]. В 2004 и 2008 гг. зарегистрированы 2 случая сибирской язви среди КРС в Финляндии [13].

Стационарно неблагополучные по сибирской язве пункты (СНП) содержат почвенные очаги, сформировавшиеся на месте гибели или захоронения павших от сибирской язви животных. Они являются потенциально опасными территориями по возникновению заболеваний сибирской язвой среди животных и людей, так как их естественная санация вследствие антагонизма почвенных микроорганизмов и инсоляции проходит очень медленно [14–15]. До начала 50-х гг. прошлого века трупы павших животных захоранивали в земляных ямах, позже – в скотомогильниках. Лишь после выхода инструкции «О мероприятиях против сибирской язви», утверж-

денной Министерством сельского хозяйства СССР 28.02.1953, трупы павших от сибирской язви животных стали сжигать.

Основными причинами, вызывающими заболевания среди животных, являются эрозия почвы на поверхности сибирезовенных захоронений, вымывание возбудителей сибирской язви талыми водами и во время наводнений, а за полярным кругом – оттаивание вечной мерзлоты в связи с потеплением климата, в результате чего возбудитель сибирской язви оказывается на поверхности почвы и инфицирует травяной покров, поедаемый травоядными животными.

Лабораторные исследования по изучению наиболее благоприятных условий существования *Bacillus anthracis* в почве доказали, что такими факторами являются щелочность почвы, количество гумуса и высокий уровень кальция в почве. Большое значение имеют также температура и влажность почвы. Именно эти условия способствуют росту бактерий, выживанию, секреции токсинов и образованию спор [16].

Формы течения сибирской язви у наиболее распространенных в сельском хозяйстве животных различают по скорости развития: молниеносная апopleктическая инфекция у овец, острая – у КРС и лошадей, хроническая – у свиней. Другие домашние животные, в том числе мелкие, а также человек обладают относительной резистентностью. Преимущественное эпизоотологическое значение представляет заболеваемость продуктивных животных – крупного и мелкого рогатого скота (МРС) [17].

Целью исследования являлась характеристика эпидемиологической и эпизоотической ситуации по сибирской язве среди людей и животных, сложившейся в Республике Татарстан.

Материалы и методы

Анализ эпидемиологической и эпизоотологической ситуации основан на архивных данных за период 1920–2020 гг., эпидемиологических картах заболевших сибирской язвой (1980–2019 гг.), результатах эпизоотолого-эпидемиологического обследования очагов сибирской язви Управлением Роспотребнадзора по Республике Татарстан и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан», материалах

о сибирской язве животных за период 1948–2020 гг. Главного управления ветеринарии Республики Татарстан. (Сохранились архивные данные по заболеваемости людей сибирской язвой за период 1920–2020 гг. и по животным за период 1948–2020 гг.)

Микробиологические исследования проб от больных и из объектов окружающей среды проводили в соответствии с требованиями МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы», для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали тест-систему «АмплиСенс *Bacillus anthracis*-FRT» (ЦНИИЭ, Москва). Статистическая обработка данных проводилась с помощью метода квантильного ранжирования.

Результаты и обсуждение

В Республике Татарстан сибирская язва регистрируется с давних времен, но на протяжении второй половины XX в. и в начале XXI в. динамика заболеваний сибирской язвой среди людей и животных в регионе существенно изменилась.

Анализ архивных данных за период 1948–2020 гг. показал, что в республике имело место неуклонное снижение количества заболевших сибирской язвой животных (рис. 1). Это, вероятно, связано с естественной санацией почвенных очагов под воздействием природных факторов, ввиду давности захоронений, а также с благоустройством скотомогильников. Немаловажное значение имела и обязательная вакцинация сельскохозяйственных животных (СХЖ) против сибирской язвы. Ежегодно в Татарстане иммунизируются против сибирской язвы более 2 млн голов СХЖ.

Всего за период 1948–2020 гг. зарегистрировано 917 случаев заболеваний животных сибирской язвой. Среди заболевших сибирской язвой СХЖ доминировал КРС (70 %), МРС составил 12,2 %, свиньи – 9,8 %, лошади – 8,0 %.

Суммарное количество заболевших животных за данный период по отдельным муниципальным районам республики было неравномерным и варьировало от 85 в Елабужском районе до полного отсутствия в 4 районах (Атнинский, Менделеевский,

Новошешминский, Тюлячинский) и г. Набережные Челны. Анализ, проведенный методом квантильного ранжирования, позволил выделить четыре группы муниципальных районов по количеству случаев сибирской язвы среди СХЖ: 1) с высоким, 2) средним, 3) низким уровнем и 4) отсутствием заболеваний среди животных. Всего в республике 45 муниципальных образований. К муниципальным образованиям с высоким уровнем (от 60 до 85 случаев) отнесены 3 (Арский, Елабужский и Мензелинский районы); со средним уровнем (от 31 до 59 случаев) – 7 (Алексеевский, Бавлинский, Буинский, Высокогорский, Пестречинский, Тукаевский, Чистопольский районы); с низким уровнем (от 1 до 30 случаев) – 30 муниципальных образований (Агрызский, Азнакаевский, Аксубаевский, Актанышский, Алькеевский, Альметьевский, Апастовский, Балтасинский, Бугульминский, Верхнеуслонский, Дрожжановский, Заинский, Зеленодольский, Кайбицкий, Камскоустынский, Кукморский, Лаишевский, Лениногорский, Мамадышский, Муслумовский, Нижнекамский, Нурлатский, Рыбнослободский, Сабинский, Сармановский, Спасский, Тетюшский, Черемшанский, Ютазинский районы и г. Казань). Не регистрировались заболевания сибирской язвой среди животных в 5 муниципальных образованиях (Атнинский, Менделеевский, Новошешминский, Тюлячинский районы и г. Набережные Челны).

Основными причинами заболеваний животных сибирской язвой были неполный охват вакцинацией поголовья скота, выпас скота либо заготовка кормов на территории сибиреязвенных скотомогильников или мест неустановленных сибиреязвенных захоронений животных.

Нами проанализирована эпидемиологическая ситуация по сибирской язве среди людей в Республике Татарстан за период с 1920 по 2020 год (рис. 2, табл. 1).

Интенсивные показатели заболеваемости неуклонно снижались на протяжении всего анализируемого периода. Так, среднемноголетний показатель заболеваемости сибирской язвой населения (на 100 тыс. населения) за период 1920–1953 гг. со-

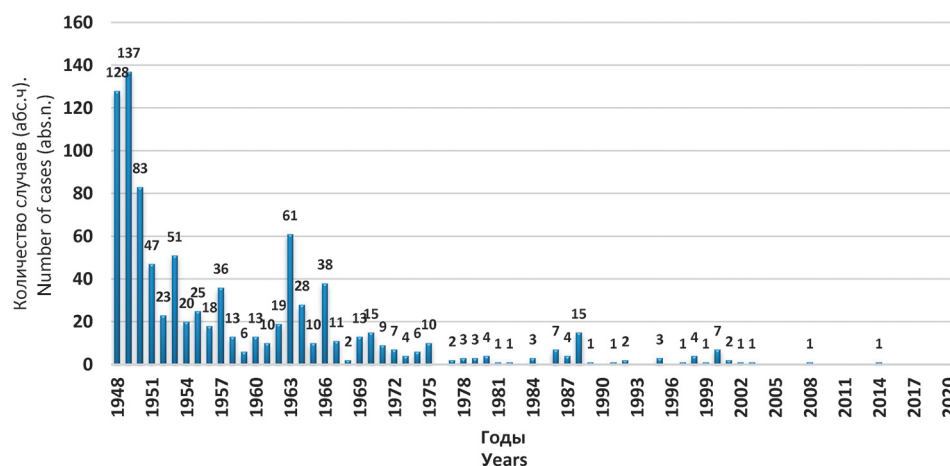


Рис. 1. Количество животных, заболевших сибирской язвой по Республике Татарстан за период 1948–2020 гг.

Fig. 1. Number of animal anthrax cases in the Republic of Tatarstan over the period of 1948–2020.

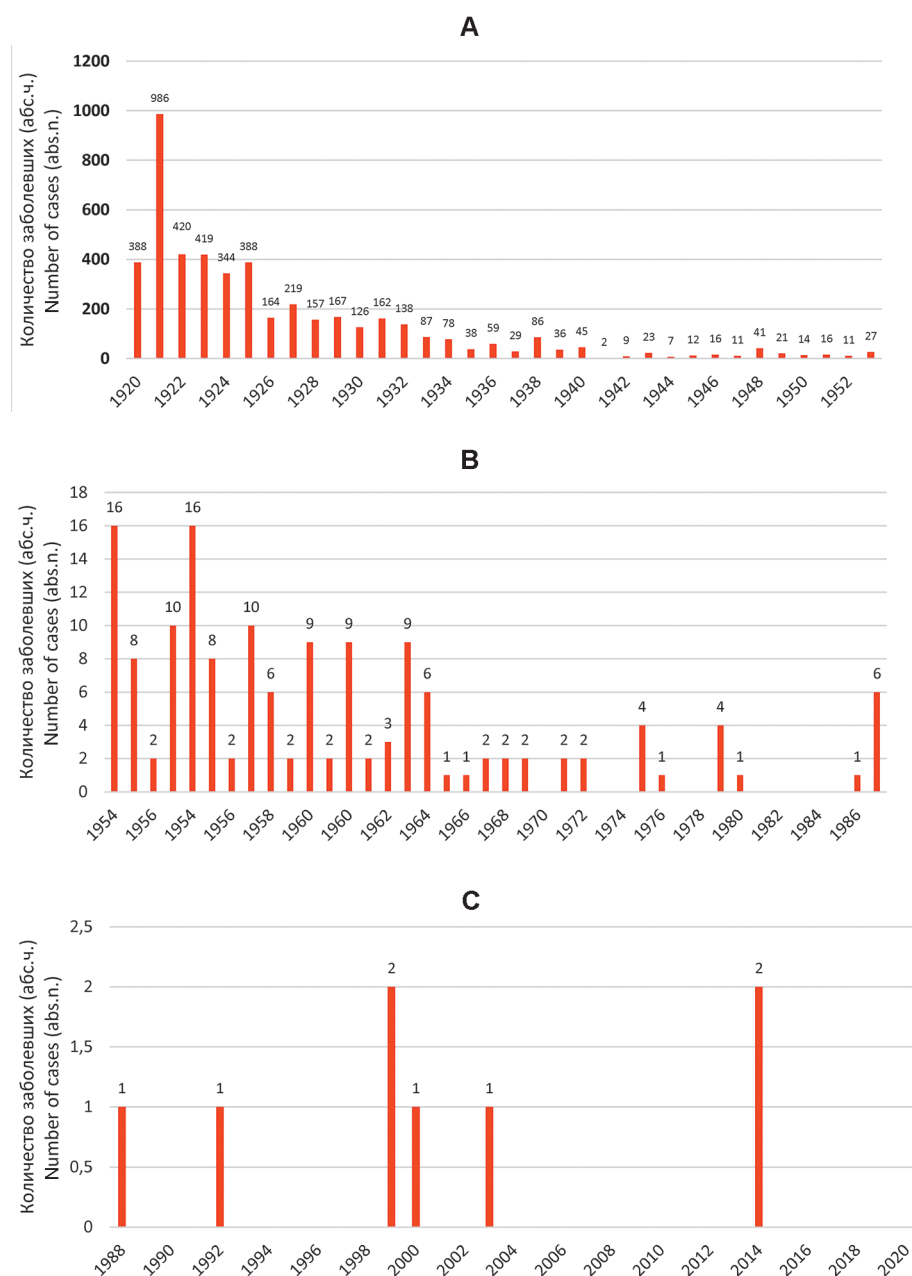


Рис. 2. Количество заболевших сибирской язвой людей в Республике Татарстан за период 1920–2020 гг.

Fig. 2. The number of human anthrax cases in the Republic of Tatarstan over the period of 1920–2020.

ставил ($4,9 \pm 1,2$); за 1954–1987 гг. – ($0,09 \pm 0,02$); за 1988–2020 гг. – ($0,007 \pm 0,001$).

Количество случаев заболевания животных сибирской язвой также неуклонно снижалось. Так, за период 1948–1953 гг. заболело сибирской язвой 469 голов СХЖ, за 1954–1987 гг. – 407 и за 1988–2020 гг. – 41.

Таким образом, можно констатировать значительное снижение количества заболевших сибирской язвой среди людей и СХЖ до единичных случаев за последние 40 лет.

Нами проанализированы эпидкарты больных сибирской язвой за 1980–2020 гг., материалы собственных эпизоотолого-эпидемиологических исследований очагов сибирской язвы среди животных и людей. За данный период в Республике Татарстан зарегистрировано 16 случаев (14 мужчин и 2 женщины) заболеваний людей сибирской язвой в 7 муниципальных районах (Алексеевский – 1, Бавлинский – 1,

Кукморский – 8, Сармановский – 2, Агрызский – 1, Зеленодольский – 1 и г. Набережные Челны – 2). Отмечался сезонный характер заболеваемости, наибольшее число заболевших было в летние месяцы: июнь – 42,8 %, июль – 28,6 %. В возрастной структуре заболевших преобладали лица в возрасте 30–49 лет – 11 случаев (68,8 %), в остальных возрастных группах регистрировались единичные случаи: 50–59 лет – 3 (18,7 %); 20–29 лет – 1 (6,25 %) и 60 лет и старше – 1 (6,25 %) случай. В социально-профессиональном составе заболевших преобладали лица, имевшие профессиональный контакт с животными. Из числа заболевших было 5 работников сельского хозяйства (31,2 %), 1 ветеринар (6,25 %), 1 зоотехник (6,25 %), 1 пастух (6,25 %), 2 животновода (12,55 %), 6 человек из прочих категорий (37,5 %) (пенсионеры, неработающие граждане, работники промышленных предприятий и торговли). Основными причинами заражения являлись вынужденный убой скота без

Таблица 1 / Table 1

Заболеемость людей сибирской язвой по Республике Татарстан за период 1920–2020 гг.
Anthrax incidence among the population of the Republic of Tatarstan over the period of 1920–2020

Годы Years	Заболело всего Total number of the persons who got sick	Показатель на 100 тыс. населения Value per 100 thousand of the population	Годы Years	Заболело всего Total number of the persons who got sick	Показатель на 100 тыс. населения Value per 100 thousand of the population
1920	388	12,00	1959	2	0,07
1921	986	30,00	1960	9	0,30
1922	420	14,00	1961	2	0,06
1923	419	16,50	1962	3	0,10
1924	344	13,00	1963	9	0,30
1925	388	15,00	1964	6	0,19
1926	164	6,30	1965	1	0,03
1927	219	8,00	1966	1	0,03
1928	157	6,00	1967	2	0,06
1929	167	6,00	1968	1	0,03
1930	126	5,00	1969	2	0,06
1931	162	6,00	1970	0	0
1932	138	5,00	1971	2	0,06
1933	87	3,00	1972	2	0,06
1934	78	2,80	1973	0	0
1935	38	1,50	1974	0	0
1936	59	2,00	1975	4	0,12
1937	29	1,00	1976	1	0,03
1938	86	3,00	1977	0	0
1939	36	1,20	1978	0	0
1940	45	1,60	1979	4	0,11
1941	2	0,07	1980	1	0,03
1942	9	0,33	1981–1985	0	0
1943	23	0,89	1986	1	0,03
1944	7	0,28	1987	6	0,16
1945	12	0,47	1954–1987	101	0,09±0,02
1946	16	0,50	1988	1	0,03
1947	11	0,43	1989–1991	0	0
1948	41	1,50	1992	1	0,03
1949	21	0,70	1993–1998	0	0
1950	14	0,50	1999	2	0,06
1951	16	0,60	2000	1	0,03
1952	11	0,40	2001	0	0
1953	27	1,00	2002	0	0
1920–1953	4746	4,90±1,2	2003	1	0,03
1954	16	0,58	2004–2013	0	0
1955	8	0,28	2014	2	0,06
1956	2	0,07	2015–2020	0	0
1957	10	0,35	1988–2020	8	0,007±0,001
1958	6	0,21			

ветеринарного осмотра, разделка туш, реализация мяса и мясопродуктов без проведения надлежащей ветеринарно-санитарной экспертизы (12 случаев), контакт с сырьем животного происхождения (1) и почвенным очагом сибирской язвы (3).

Обратились за медицинской помощью в первые два дня от начала заболевания 9 человек из 16, на 3–5-й день – 4, на 6-й день и более – 3. Наибольшее число заболевших госпитализированы в первые

два дня с момента обращения за медицинской помощью. Диагноз установлен в первые два дня с момента обращения только у 5 пациентов, у остальных больных – на 3–6-й день. Первоначальный диагноз у 10 пациентов – «сибирская язва, кожная форма под вопросом», у 3 заболевших поставлен диагноз «инфицированная рана», в остальных случаях – «рожа», «ожог от сварки», «химический ожог». В 15 из 16 случаев установлен окончательный диагноз

«сибирская язва, кожная форма», клинический исход болезни – выздоровление, в одном случае с диагнозом «сибирская язва, генерализованная форма» был летальный исход. Во всех случаях проводилось бактериологическое исследование отделяемого из карбункулов и кожных поражений при кожной форме сибирской язвы, при генерализованной форме исследовалась кровь и патологоанатомический материал. Все диагнозы подтверждены бактериологическими методами исследований. Все заболевания были спорадическими – по 1–2 человека заражались от одного источника инфекции – больного сибирской язвой животного, групповых заболеваний не было, за исключением трех больных, заразившихся в почвенном очаге.

В с. Шарлерама Сармановского района (1999 г.) одна жительница села и два жителя г. Набережные Челны заболели сибирской язвой вследствие проведения строительных работ с выемкой грунта на месте неучтенного сибиреязвенного захоронения животного, павшего от сибирской язвы. Один из заболевших скончался от генерализованной формы сибирской язвы, у двоих заболевших диагностирована кожная форма. Инфицированность грунта и других объектов внешней среды подтверждена бактериологическими исследованиями. На месте почвенного очага проведены противоэпидемические и дезинфекционные мероприятия: обеззараживание грунта, бетонирование места выемки грунта, охват населения профилактическими прививками.

Последние два случая заболевания людей сибирской язвой в Республике Татарстан были в 2014 г. в Кукморском районе [18]. Заражение людей произошло во время вынужденного убоя больной сибирской язвой телки на частном подворье.

Большое значение в профилактике заболеваний сибирской язвой имеет иммунизация профессиональных групп сибиреязвенной вакциной. Ежегодно в Республике Татарстан прививаются против сибир-

ской язвы более 2 тыс. человек, относящихся к группам риска: лица, работающие в лабораториях и проводящие исследования на сибирскую язву, а также лица, производящие убой скота, занятые заготовкой, сбором, хранением, транспортировкой, переработкой и реализацией сырья животного происхождения и др. (табл. 2).

Согласно данным Кадастра СНП РФ (2005 г.) в Республике Татарстан насчитывается 1097 стационарно неблагополучных по сибирской язве населенных пунктов. По данным Главного управления ветеринарии Кабинета министров Республики Татарстан, в республике находятся 1065 сибиреязвенных захоронений животных, из них местонахождение 808 известно и 257 неизвестно.

Общая площадь сибиреязвенных скотомогильников составляет 80200 м². Скотомогильников давностью захоронения свыше 100 лет – 837. Согласно распоряжению Кабинета министров Республики Татарстан от 21.04.2012 № 620-р утвержден перечень сибиреязвенных скотомогильников и биотермических ям. В целях обеспечения биологической безопасности в рамках Государственной программы «Система химической и биологической безопасности Республики Татарстан на 2015–2020 гг.», постановлением Кабинета министров Республики Татарстан от 24.09.2014 № 672 предусматривалось проведение мероприятий по содержанию сибиреязвенных скотомогильников и биотермических ям. Ежегодно из бюджета Республики Татарстан муниципальным районам выделяются субвенции для приведения сибиреязвенных скотомогильников и биотермических ям в надлежащее ветеринарно-санитарное состояние. За последние годы определены географические координаты 808 скотомогильников, местонахождение которых известно, проведена установка бетонных саркофагов, траншей и аншлагов. Таким образом, все сибиреязвенные скотомогильники, для которых известно местонахождение, приведены в соответствие

Таблица 2 / Table 2

Охват профилактическими прививками против сибирской язвы в Республике Татарстан за период 2009–2020 гг.

Coverage of preventive vaccinations against anthrax in the Republic of Tatarstan for the period of 2009–2020

Годы Years	Вакцинация Vaccination			Ревакцинация Revaccination		
	план planned	привито vaccinated	охват, % coverage, %	план planned	привито vaccinated	охват, % coverage, %
2009	407	440	108,1	2667	2188	82,0
2010	459	520	113,2	1526	1556	101,9
2011	302	451	149,3	1563	1512	96,7
2012	260	305	117,3	1480	1353	91,4
2013	629	320	50,8	1531	699	45,6
2014	601	878	146,1	1102	1026	93,1
2015	973	781	80,2	1238	1132	91,4
2016	408	475	116,4	1759	1699	96,5
2017	290	393	135,5	1961	1965	100,2
2018	325	489	150,4	1973	1934	98,0
2019	780	800	102,5	2056	1992	96,8
2020	260	259	99	1670	1882	112

существующим ветеринарно-санитарным требованиям. Тем не менее часть сибиреязвенных скотомогильников по тем или иным причинам оказывалась на территории населенных пунктов, где в санитарно-защитных зонах велось строительство жилых и нежилых объектов. Ранее санитарно-защитные зоны были сокращены с 1000 до 500 м у 144 скотомогильников, менее 500 м – у 16. Всего на территории населенных пунктов расположены 299 сибиреязвенных захоронений, 534 находятся в радиусе 5 км от населенных пунктов, 320 – в лесопарковой зоне, 21 – в водоохранной зоне.

С целью профилактики заражения людей в результате контакта с почвой на участках, отводимых под строительство жилых и иных объектов, а также при проведении строительных работ на предполагаемой территории неустановленных сибиреязвенных скотомогильников, в Республике Татарстан проводятся мероприятия по обследованию почвы на сибирскую язву. Так, за период 2012–2019 гг. исследовано 9534 пробы почвы на 808 местах предполагаемого строительства зданий и прокладки трубопроводов, результаты были отрицательными. Проводятся микробиологические исследования воды 16 открытых водоемов и сточных вод. Всего за данный период исследовано 83 пробы. При работе в 16 очагах сибирской язвы исследовано 35 смывов с объектов внешней среды, результаты – отрицательные.

Подводя итоги проведенному ретроспективному анализу эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве в Республике Татарстан за период 1920–2020 гг., можно сделать следующие выводы:

- заболеваемость сибирской язвой населения неуклонно снижалась на протяжении всего анализируемого периода – за периоды 1920–1953 и 1988–2020 гг. с 4,9 до 0,007 на 100 тыс. населения соответственно;

- за последние 40 лет заболевания животных сибирской язвой также неуклонно снижались до единичных случаев, среди заболевших СХЖ преобладал КРС;

- из 45 муниципальных образований республики к категории с высоким уровнем заболеваний СХЖ отнесены 3 (Арский, Елабужский и Мензелинский районы); со средним уровнем – 7 (Алексеевский, Бавлинский, Буинский, Высокогорский, Пестречинский, Тукаевский, Чистопольский районы); с низким уровнем – 30; не регистрировались заболевания сибирской язвой среди животных в 5 муниципальных образованиях;

- за последние 40 лет (1980–2020 гг.) сибирской язвой в основном болели мужчины (87,5 %), лица в возрасте 30–49 лет (68,8 %), работники сельского хозяйства (31,2 %); заболевания связаны с вынужденным убоем скота без ветеринарного осмотра, разделкой туш, реализацией мяса и мясопродуктов без проведения надлежащей ветеринарно-санитарной экспертизы;

- эпизоотологическая ситуация по сибирской язве в Республике Татарстан значительно улучши-

лась, что, вероятно, связано с естественной санацией почвенных очагов под воздействием природных факторов ввиду давности захоронений, а также с проведением ветеринарно-санитарных профилактических мероприятий, включающих в себя ветеринарно-санитарную экспертизу, обязательную вакцинацию СХЖ против сибирской язвы и благоустройство сибиреязвенных скотомогильников;

- снижение заболеваемости среди людей связано с улучшением эпизоотологической ситуации и проведением профилактических мероприятий, включающих в себя профилактическую иммунизацию профессиональных контингентов, относящихся к группам риска;

- в целях недопущения заболевания сибирской язвой людей и животных необходимо проводить лабораторные исследования почвы на наличие возбудителей сибирской язвы при земляных и строительных работах в муниципальных районах, где, по данным Главного управления ветеринарии, имеются сибиреязвенные скотомогильники с неустановленным местонахождением, особенно принимая во внимание наличие на территории республики 257 сибиреязвенных скотомогильников, местонахождение которых неизвестно или известно приблизительно;

- необходимо поддерживать высокий уровень охвата специфической вакцинацией поголовья СХЖ, а также продолжать иммунизацию лиц, относящихся к профессиональным группам риска.

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

Список литературы

1. Базарова Г.Х., Дугаржапова З.Ф., Мищенко А.И., Лукьяненко Н.В., Шевченко В.В. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по сибирской язве в Алтайском крае и Республике Алтай (1985–2015 гг.). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 4:11–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-11-14.
2. Рязанова А.Г., Скударева О.Н., Герасименко Д.К., Семенова О.В., Аксенова Л.Ю., Еременко Е.И., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Варфоломеева Н.Г., Печковский Г.А., Чмеренко Д.К., Куличенко А.Н. Анализ ситуации по сибирской язве в 2019 г., прогноз на 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:57–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-57-61.
3. Nakanwagi M., Ario A.R., Kwagonza L., Aceng F.L., Mwesigye J., Bulage L., Buule J., Sendagala J.N., Downing R., Zhu B.P. Outbreak of gastrointestinal anthrax following eating beef of suspicious origin: Isingiro District, Uganda, 2017. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008026. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008026.
4. Hueffer K., Drown D., Romanovsky V., Hennessy T. Factors contributing to anthrax outbreaks in the Circumpolar North. *EcoHealth*. 2020; 17(1):174–80. DOI: 10.1007/s10393-020-01474-z.
5. Li S., Ma Q., Chen H., Tang G., Wang D. Epidemiological investigation and etiological analysis of a cutaneous anthrax epidemic caused by butchering sick cattle in Guizhou, China. *Front. Public Health*. 2020; 8:65. DOI: 10.3389/fpubh.2020.00065.
6. Kutmanova A., Doganay M., Zholdoshev S. Human anthrax in Kyrgyz Republic: Epidemiology and clinical features. *J. Infect. Public Health*. 2020; 13(8):1161–5. DOI: 10.1016/j.jiph.2020.02.043.
7. Обзор инфекционной и паразитарной заболеваемости за январь–декабрь 2019 г. в Киргизской Республике. Официальный сайт Министерства здравоохранения Кыргызской Республики. [Электронный ресурс]. URL: <https://dgsen.kg/category/deyatelnost/upravlenie-profilaktiki-infekcionnY/ezhemesYachnYj-bjulletensjesizn> (дата обращения 23.07.2020).
8. Вспышка сибирской язвы в Гегаркуникской области Армении. Официальный сайт ТАСС. [Электронный ресурс]. URL: <https://tass.ru/proisshestviya/6778468> (дата обращения 20.07.2020).

9. Сибирская язва – Азербайджан (Сабирабадский район). [Электронный ресурс]. 1 августа 2019 г. URL: <http://promedmail.org/ru>. Archive number: 20190801.6600945 (дата обращения 16.01.2020).
10. Сибирская язва, 4 человека – Казахстан (Акмолинская область). [Электронный ресурс]. 20 августа 2019 г. URL: <http://promedmail.org/ru>. Archive number: 20190820.6632100 (дата обращения 14.01.2020).
11. Сибирская язва (4 случая) – Казахстан. [Электронный ресурс]. 16 сентября 2019 г. URL: <http://promedmail.org/ru>. Archive number: 20190916.6677552 (дата обращения 15.01.2020).
12. Сибирская язва (животные) – Беларусь (Брестская область). [Электронный ресурс]. 14 августа 2019 г. URL: <http://promedmail.org/ru>. Archive number: 20190814.6622687 (дата обращения 22.01.2020).
13. Friman M., Kakko L., Constantin C., Simojoki H., Andersson M.A., Nagy S., Salonen H., Andersson M. An atypical *Bacillus anthracis* infection in a bull-A potential occupational health hazard. *Reprod. Domest. Anim.* 2019; 54(9):1279–83. DOI: 10.1111/rda.13532.
14. Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Селиверстов В.В. Сибирская язва (Антракс): Новые страницы в изучении «старой» болезни. Владимир: Посад; 2001. 283 с.
15. Гаврилов В.А., Тихонов И.В., Девришов Д.А. Проблема ликвидации сибирской язвы в России. *Ветеринарная медицина*. 2011; 2:64–6.
16. Norris M.H., Blackburn J.K. Linking geospatial and laboratory sciences to define mechanisms behind landscape level drivers of anthrax outbreaks. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019; 16(19):3747. DOI: 10.3390/ijerph16193747.
17. Ямтитина М.Н., Макаров В.В. Глобальная эпизоотология сибирской язвы. 1. Восприимчивые животные. *Ветеринария сегодня*. 2018; 4:49–52. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-4-27-49-52.
18. Макаев Х.Н., Иванова С.В., Мельникова Л.А., Муртазина Г.Х., Гараев А.Р., Родионов А.П. Оценка риска возможного возникновения вспышек сибирской язвы в Республике Татарстан. *Казанский медицинский журнал*. 2020; 6:883–9. DOI: 10.17816/KMJ2020-883.
11. [Anthrax (4 cases) – Kazakhstan]. September 16, 2019. (Cited 15 Jan 2020). [Internet]. Available from: <http://promedmail.org/ru>. Archive Number: 20190916.6677552.
12. [Anthrax (animals) – Belarus (Brest Region)]. August 14, 2019. (Cited 22 Jan 2020). [Internet]. Available from: <http://promedmail.org/ru>. Archive Number: 20190814.6622687.
13. Friman M., Kakko L., Constantin C., Simojoki H., Andersson M.A., Nagy S., Salonen H., Andersson M. An atypical *Bacillus anthracis* infection in a bull-A potential occupational health hazard. *Reprod. Domest. Anim.* 2019; 54(9):1279–83. DOI: 10.1111/rda.13532.
14. Bakulov I.A., Gavrilov V.A., Seliverstov V.V. [Anthrax: a New Chapter in the Study of the “Old” Disease]. Vladimir: Possad; 2001. 283 p.
15. Gavrilov V.A., Tikhonov I.V., Devrishov D.A. [The problem of eliminating anthrax in Russia]. *Veterinarnaya Meditsina. [Veterinary Medicine]*. 2011; (2):64–6.
16. Norris M.H., Blackburn J.K. Linking geospatial and laboratory sciences to define mechanisms behind landscape level drivers of anthrax outbreaks. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019; 16(19):3747. DOI: 10.3390/ijerph16193747.
17. Yamtitina M.N., Makarov V.V. [Global Epizootiology of Anthrax. 1. Susceptible animals]. *Veterinarnaya Meditsina Segodnya [Veterinary Medicine Today]*. 2018; (4):27–50. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-4-27-49-52.
18. Makaev Kh.N., Ivanova S.V., Mel'nikova L.A., Murtazina G.Kh., Garaev A.R., Rodionov A.P. [Assessment of the risk of possible occurrence of anthrax outbreaks in the Republic of Tatarstan]. *Kazansky Meditsinsky Zhurnal [Kazan Medical Journal]*. 2020; (6):883–9. DOI: 10.17816/KMJ2020-883.

Authors:

Savitskaya T.A., Serova I.V., Ziatdinov V.B. Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 67, Bolshaya Krasnaya St., Kazan, 420015, Russian Federation. E-mail: kniem@mail.ru.

Trifonov V.A. Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 67, Bolshaya Krasnaya St., Kazan, 420015, Russian Federation. Kazan State Medical Academy – Affiliated Branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Ministry of Health of Russia, Kazan, Russian Federation; 11, Mushtari St., Kazan, 420012, Russian Federation; e-mail: vatrifonov@mail.ru.

Lopushov D.V. Kazan State Medical Academy – Affiliated Branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Ministry of Health of Russia. 11, Mushtari St., Kazan, 420012, Russian Federation. E-mail: doctor225@mail.ru.

Milova I.V. Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan. 13a, Sechenova St., Kazan, 420061, Russian Federation. E-mail: fguz.ooi@tatar.ru

Isaeva G.Sh. Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 67, Bolshaya Krasnaya St., Kazan, 420015, Russian Federation; e-mail: kniem@mail.ru. Kazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kazan, Russian Federation; 49, Butlerova St., Kazan, 420012, Russian Federation.

Reshetnikova I.D. Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 67, Bolshaya Krasnaya St., Kazan, 420015, Russian Federation; e-mail: kniem@mail.ru. Kazan (Volga region) Federal University; 18, Kremlevskaya St., Kazan, 420008, Russian Federation.

Об авторах:

Савицкая Т.А., Серова И.В., Зиятдинов В.Б. Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии. 420015, Казань, ул. Большая Красная, 67. E-mail: kniem@mail.ru.

Трифонов В.А. Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии; 420015, Казань, ул. Большая Красная, 67. Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 11, Муштарий, Казань, 420012, Казань, ул. Муштары, 11; e-mail: vatrifonov@mail.ru.

Лопушов Д.В. Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 420012, Казань, ул. Муштары, 11. E-mail: doctor225@mail.ru.

Милова И.В. Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан). Российская Федерация, 420061, Казань, ул. Сеченова, 13а. E-mail: fguz.ooi@tatar.ru.

Исаева Г.Ш. Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии; 420015, Казань, ул. Большая Красная, 67; e-mail: kniem@mail.ru. Казанский государственный медицинский университет; 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49.

Решетникова И.Д. Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии; 420015, Казань, ул. Большая Красная, 67; e-mail: kniem@mail.ru. Казанский (Приволжский) федеральный университет; Российская Федерация, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18.

References

1. Bazarova G.K., Dugarzhapova Z.F., Mishchenko A.I., Luk'yanenko N.V., Shevchenko V.V. [Epizootiological-epidemiological situation on anthrax in the Altai Territory and the Republic of Altai (1985–2015)]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016;(4):11–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-11-14.
2. Ryazanova A.G., Skudareva O.N., Gerasimenko D.K., Semenova O.V., Aksenova L.Yu., Eremenko E.I., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Varfolomeeva N.G., Pechkovsky G.A., Chmerenko D.K., Kulichenko A.N. [Analysis of the situation on anthrax in 2019, the forecast for 2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):59–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-57-61.
3. Nakanwagi M., Ario A.R., Kwagonza L., Aceng F.L., Mwesigye J., Bulage L., Buule J., Sendagala J.N., Downing R., Zhu B.P. Outbreak of gastrointestinal anthrax following eating beef of suspicious origin: Isingiro District, Uganda, 2017. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008026. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008026.
4. Hueffer K., Drown D., Romanovsky V., Hennessy T. Factors contributing to anthrax outbreaks in the Circumpolar North. *EcoHealth*. 2020; 17(1):174–80. DOI: 10.1007/s10393-020-01474-z.
5. Li S., Ma Q., Chen H., Tang G., Wang D. Epidemiological investigation and etiological analysis of a cutaneous anthrax epidemic caused by butchering sick cattle in Guizhou, China. *Front. Public Health*. 2020; 8:65. DOI: 10.3389/fpubh.2020.00065.
6. Kutmanova A., Doganay M., Zholdoshev S. Human anthrax in Kyrgyz Republic: Epidemiology and clinical features. *J. Infect. Public Health*. 2020; 13(8):1161–5. DOI: 10.1016/j.jiph.2020.02.043.
7. [Review of infectious and parasitic morbidity over January–December, 2019 in the Kyrgyz Republic. Official site of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic]. (Cited 23 Jul, 2020). [Internet]. Available from: <https://dgsen.kg/category/deyatelnost/upravlenie-profilaktiki-infekcionnyy-ezhemesyachnyy-julietensjeszn>.
8. [The outbreak of anthrax in the Gegarkunik region of Armenia. Official website of TASS news agency]. (Cited 20 Jul 2020). [Internet]. Available from: <https://tass.ru/proisshiestviya/6778468>.
9. [Anthrax – Azerbaijan (Sabirabad region)]. August 1, 2019. (Cited 16 Jan 2020). [Internet]. Available from: <http://promedmail.org/ru>. Archive Number: 20190801.6600945.
10. [Anthrax, 4 people – Kazakhstan (Akmola region)]. August 20, 2019. (Cited 14 Jan 2020). [Internet]. Available from: <http://promedmail.org/ru>. Archive Number: 20190820.6632100.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-137-144

УДК 616.98:579.841.95

Л.В. Саяпина¹, Н.А. Осина², Е.А. Нарышкина², А.В. Федоров², Я.М. Краснов², Д.С. Давыдов¹,
В.П. Бондарев¹

Совершенствование подходов по верификации вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения

¹ФБГУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Москва, Российская Федерация;

²ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель исследования – совершенствование способов верификации вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения в современных условиях. **Материалы и методы.** В работе обобщены результаты изучения фенотипических и генетических свойств лиофилизированных культур вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг.), хранившихся в ГКПМ ФБГУ «НЦЭСМП» Минздрава России в течение от одного года до 60 лет. **Результаты и обсуждение.** Проведенные ранее исследования выявили, что лиофилизированные культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ в основном обладали показателями, характерными для вакцинного штамма, за исключением отклонений от нормативных требований по остаточной вирулентности и специфической безопасности. Подтверждена стабильность сохранения у вакцинного штамма, хранившегося различное время в лиофилизированном состоянии, делеций в генах *pilA* и *pilE* (область дифференциации RD19) и генах, кодирующих липопротеин *lpp* (RD18). Определена специфичная для вакцинного штамма мутация C178404T (по геному штамма *F. tularensis* LVS, GenBank NCBI № CP009694) и разработан подход по ее определению. Полученные данные указывают на перспективность использования описанных выше делеций в регионах RD18/RD19 в совокупности с мутацией C178404T для оценки аутентичности вакцинного штамма с помощью молекулярно-генетических методов. Таким образом, проведенный ретроспективный анализ материалов о культурах вакцинного штамма туляремии микроба с 1940-х по 2013 год и полученные экспериментальные данные позволили дополнить новыми сведениями единые требования изготовления, изучения, поддержания, хранения и движения вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. На основании полученных результатов коллективом авторов разработан проект методических рекомендаций федерального уровня «Вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ: порядок обращения».

Ключевые слова: вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, фенотипические и генетические свойства, молекулярно-генетические методы.

Корреспондирующий автор: Саяпина Лидия Васильевна, e-mail: Sayapina@exrmed.ru.

Для цитирования: Саяпина Л.В., Осина Н.А., Нарышкина Е.А., Федоров А.В., Краснов Я.М., Давыдов Д.С., Бондарев В.П. Совершенствование подходов по верификации вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:137–144. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-137-144

Поступила 22.02.2022. Отправлена на доработку 23.05.2022. Принята к публ. 21.09.2022.

L.V. Sayapina¹, N.A. Osina², E.A. Naryshkina², A.V. Fedorov², Ya.M. Krasnov², D.S. Davydov¹,
V.P. Bondarev¹

Improvement of Approaches to the Verification of the Vaccine Strain *Francisella tularensis* 15 NIEG during Long-Term Storage

¹Scientific Center on Expertise of Medical Application Products, Moscow, Russian Federation;

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

Abstract. The aim of the study was to improve the methods for verifying the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG during long-term storage under current conditions. **Materials and methods.** The paper summarizes the results of studying the phenotypic and genetic properties of lyophilized cultures of the vaccine strain *F. tularensis* 15 NIEG (1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 and 2013) stored at SCEMAP for a period of one to 60 years. **Results and discussion.** Previous studies have revealed that freeze-dried cultures of *F. tularensis* 15 NIEG generally had the characteristics of the vaccine strain, with the exception of deviations from the regulatory requirements for residual virulence and specific safety. The stability of preservation of deletions in the *pilA* and *pilE* genes (the region of differentiation RD19) and the genes encoding *lpp* lipoprotein (RD18) in the vaccine strain, which was stored for various periods of time in a lyophilized state, has been confirmed. The vaccine-strain-specific mutation C178404T (by the genome of *F. tularensis* LVS strain, GenBank NCBI no. CP009694) has been identified, and an approach to determine it has been developed. The data obtained are promising as regards using the above deletions in the RD18/RD19 regions in combination with the C178404T mutation to assess the authenticity of the vaccine strain using molecular genetic methods. Thus, the conducted retrospective analysis of the data on the cultures of tularemia microbe vaccine strain from the 1940s to 2013 and the gathered experimental data, made it possible to supplement the uniform requirements for the manufacture, study, maintenance, storage and movement of *F. tularensis* 15 NIEG vaccine strain with new evidence. Based on the results obtained, the authors have drawn a draft methodological recommendations of the federal level “Vaccinal strain *Francisella tularensis* 15 NIEG: order of handling”.

Key words: *Francisella tularensis* 15 NIEG vaccine strain, phenotypic and genetic properties, molecular-genetic methods.

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

Corresponding author: Lidiya V. Sayapina, e-mail: Sayapina@expmed.ru.

Citation: Sayapina L.V., Osina N.A., Naryshkina E.A., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M., Davydov D.S., Bondarev V.P. Improvement of Approaches to the Verification of the Vaccine Strain *Francisella tularensis* 15 NIIЭГ during Long-Term Storage. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:137–144. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-137-144

Received 22.02.2022. *Revised* 23.05.2022. *Accepted* 21.09.2022.

Sayapina L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2272-2621>
Osina N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0954-5683>
Naryshkina E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>
Fedorov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>

Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>
Davydov D.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>
Bondarev V.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

Заболевание туляремией регистрируется во многих странах мира, в том числе и в России. В настоящее время природные очаги туляремии распространены практически во всех регионах нашей страны. Большое значение в борьбе с туляремией отводится профилактическим мероприятиям, в том числе вакцинации населения.

Впервые вакцинация против туляремии проведена Л.М. Хатеневым и Г.Я. Синаем в 1931 г. в юго-восточном Казахстане глицериновой инаktivированной туляремийной вакциной. Позднее Н.А. Гайский и Б.Я. Эльберт (1932–1936 гг.) доказали возможность создания стойкого иммунитета при введении живой вакцины. Используя метод аттенуации, получены два кандидата в вакцинные штаммы: *Francisella tularensis* № 15 и Ондатра IV. Штамм *F. tularensis* № 15 признан вакцинным, так как более стабилен при хранении [1, 2].

Впоследствии многократные пересевы (в течение 15 лет) штамма *F. tularensis* № 15 привели к снижению его остаточной вирулентности и, как следствие, к снижению иммуногенности. Для восстановления иммунобиологических свойств в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи проведена анимализация штамма через организм морских свинок. Полученный вариант штамма *F. tularensis* №15-восстановленный впоследствии еще дважды подвергался восстановлению иммуногенных свойств и получил название «вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ» [3–5].

В настоящее время штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ хранится в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III–IV групп патогенности (ГКПМ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, производство живой туляремийной вакцины осуществляется в АО «НПО «Микроген» (филиал в г. Омске).

В сложившихся современных условиях отсутствует руководящий документ, регламентирующий единые требования к порядку изготовления, изучения, поддержания и хранения вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Анализ нормативных документов, в которых приведены требования к вакцинным штаммам возбудителей особо опасных инфекций, в том числе и туляремии (МУ 3.31.2161-07. Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба), показывает, что в них отсутствуют требования к генетической стабильности штамма, в описательной форме приведены технологические операции по культивированию и лиофилизации

вакцинного и кандидатов в вакцинные штаммы. При этом доступные сведения имеют разную степень детализации свойств вакцинного штамма.

Отсутствие единых подходов к алгоритму поддержания производственного штамма, используемого при изготовлении туляремийной вакцины, может привести в процессе хранения к изменению основных иммунобиологических свойств и несвоевременной их корректировке в случае выявления несоответствия отдельных показателей установленным требованиям. Актуальность проблемы подтверждается исследованиями зарубежных авторов по разработке кандидатов в вакцинные живые туляремийные штаммы с целью сопоставления известных характеристик, связанных с их аттенуацией и иммуногенной активностью [6–8].

Учитывая вышеизложенное, необходимость регламентирования нормативных требований к порядку поддержания и изучения основных свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в процессе его хранения и поддержания не вызывает сомнений [9], что согласуется с рекомендациями ВОЗ по производству и контролю качества вакцинных препаратов для обеспечения их безопасности и эффективности [10].

На первом этапе важной составляющей является определение единых научно обоснованных подходов и требований к порядку изготовления, изучения, хранения и поддержания эталонной линии вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, предназначенного для производства вакцины туляремийной живой, аллергена туляремийного жидкого (Тулярин) и диагностических противотуляремийных препаратов.

Цель работы – совершенствование способов верификации вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения.

Задачи исследования:

1. Провести анализ нормативных документов, отражающих требования к вакцинным штаммам против особо опасных инфекций.

2. Обобщить данные, полученные при изучении фенотипических свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

3. Определить наиболее информативные методы изучения генетических свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ для его аутентификации.

4. Разработать методические рекомендации «Вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ: порядок обращения».

Материалы и методы

В работе обобщены результаты изучения фенотипических и генетических свойств, а также отсутствия посторонних микроорганизмов и грибов в лиофилизированных культурах вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг.), хранившихся в ГКПМ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России при температуре минус $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение от одного года до 60 лет. В процессе исследования проанализированы паспорта контроля качества 48 лиофилизированных культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученных на базе Одесского предприятия производства бактериальных препаратов в 1980, 1987 и 1990 гг., и 28 паспортов качества – на предприятии НПО «Микроген» (филиал в Омске) за 2003–2013 гг.

Ферментативная активность культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, а также образование сероводорода и индола изучены с использованием питательной среды Dawns, модульного анализатора бактериологического bioMerieux VITEK® 2 Systems, аналитических карт типа bioMerieux GN (21341) и систем индикаторных бумажных (СИБ). Серологические свойства исследовали с использованием коммерческой сыворотки диагностической туляреминой сухой для РА; отсутствие посторонних бактерий и грибов – последующей оценкой однородности тинкториальных свойств культур и микроскопией мазков. Иммунобиологические свойства (остаточная вирулентность, специфическая безопасность, иммуногенность, прививаемость) штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ определяли на беспородных белых мышах (масса 18–20 г) и морских свинках (масса 300–450 г).

Исследования генетических свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводили методами ERIC- и RAPD-типирования в соответствии с рекомендациями авторов [11], ПЦР и фрагментного секвенирования (по общепринятой методике) в Российском противочумном институте «Микроб».

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми статистическими методами, рисунки и графики – с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 2010.

Результаты и обсуждение

До 2011 г. в Российской Федерации существовала единая система, которая определяла требования к организации производства и контроля качества иммунобиологических препаратов, в том числе и вакцин против особо опасных инфекций. При этом порядок изготовления, изучения, поддержания и хранения штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, а также условия его получения и использования перед каждым производственным циклом изготовления вакцины были прописаны недостаточно полно в Промышленном регламенте на вакцину туляремию живую (утверж-

дался руководителем учреждения-производителя и согласовывался в ГИСК им. Л.А. Тарасевича).

В ведущих фармакопеях мира (Европейская, Британская, Фармакопея США и др.) ввиду отсутствия производства живых вакцин против особо опасных инфекций требования к живым вакцинным штаммам отсутствуют [12, 13]. В то же время WHO Good Manufacturing Practices for biological products, WHO Expert Committee on Biological Standardization, Международный совет по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для медицинского применения (ICH), Государственная фармакопея Российской Федерации рекомендуют тщательно подходить к выбору и давать детальную характеристику вакцинным штаммам и составу вакцин [14–16].

Ранее нами изучены фенотипические, генетические свойства и иммунобиологические показатели вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранившегося в лиофилизированном состоянии с 1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг. [17, 18]. При этом иммуногенность вакцинного штамма изучалась на базе трех профильных учреждений. Установлено, что в основном все лиофилизированные культуры вакцинного штамма обладали показателями, характерными для вакцинного штамма, использующегося в производстве живой туляреминой вакцины, однако в ряде случаев наблюдались отклонения от нормативных требований по остаточной вирулентности и специфической безопасности. Результаты ежегодного изучения остаточной вирулентности штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (с 1987 по 2013 год) на производственных площадках и в специализированной лаборатории показали, что представляется необходимым снизить верхнюю границу данного показателя в сторону уменьшения: с $2 \cdot 10^6$ м.к. до $5 \cdot 10^3$ м.к. [19].

Известно, что иммуногенность вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ напрямую связана с его остаточной вирулентностью, которая обеспечивает приживаемость, размножение патогена в макроорганизме и формирование активного противотуляреминого иммунитета [20–23]. Полученные результаты позволили сформулировать основные требования, предъявляемые к изучению, изготовлению, хранению и поддержанию вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, которые нашли отражение в проекте методических рекомендаций федерального уровня, а именно: вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ должен обладать типичными культурально-морфологическими, биохимическими, иммунобиологическими и генетическими свойствами для рода *Francisella*, вида *tularensis*, подвида *holarctica*, которые представлены в таблице.

В ходе проведения экспериментов подтверждена стабильность сохранения у вакцинного штамма, хранившегося в лиофилизированном состоянии с 1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг., делеций в генах *pilA* и *pilE* (область дифференциации

Основные свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ
Basic properties of *F. tularensis* 15 NIEG vaccine strain

Показатели Indicators	Методы Methods	Норма Standard
Окраска по Граму Gram Staining	Микроскопический Microscopic	Грамотрицательные палочковидные или кокковидные плеоморфные бактерии Gram-negative rod-shaped or coccoid pleomorphic bacteria
Культурально-морфологические свойства Cultural and morphological properties	Бактериологический Bacteriological	SR – тип колоний (белый цвет) – не менее 80 % SR – colony type (white) – not less than 80 %
Ферментативная активность Enzymatic activity	Биохимический Biochemical	Глюкоза + (кислота) Glucose + (acid)
		Мальтоза + (кислота) Maltose + (acid)
		Левулеза + (кислота) Levulase + (acid)
		Манноза + (кислота) Mannose + (acid)
		Глицерин – Glycerin –
		Цитруллин – Citrulline –
		Сероводород + Hydrogen sulfide +
		Индол – Indole –
Антигенные свойства Antigenic properties	Серологический, реакция агглютинации Serological, agglutination reaction	Агглютинация (крупнохлопчатый агглютинат) до титра сыворотки туляремии Agglutination (coarse agglutinate) up to the titer of tularemia serum
Чистота культуры Purity of the culture	Отсутствие посторонних бактерий и грибов Absence of foreign bacteria and fungi	Чистая культура туляремийного микроба Pure culture of the tularemia microbe
Остаточная вирулентность Residual virulence	Биологический Biological	от $1 \cdot 10^2$ до $5 \cdot 10^3$ м.к. from $1 \cdot 10^2$ to $5 \cdot 10^3$ m.c.
Иммуногенность Immunogenicity	Биологический Biological	ЕД ₅₀ – не более 1000 м.к. ED ₅₀ – no more than 1000 m.c.
Генетические свойства Genetic properties	ПЦР PCR	Наличие генетических маркеров: <i>iglBC</i> , <i>fopA</i> и др. (вид <i>Francisella tularensis</i>), Ft-M19, <i>ISFtu2</i> и др. (подвид <i>holarctica</i>), Δ526 п.н. <i>pilA-pilE</i> , Δ1480 п.н. <i>lpp</i> , SNP C178404T (штамм 15 НИИЭГ) Presence of genetic markers: <i>iglBC</i> , <i>fopA</i> , etc. (<i>Francisella tularensis</i> species), Ft-M19, <i>ISFtu2</i> , etc. (subspecies <i>holarctica</i>), Δ526 b.p. <i>pilA-pilE</i> , Δ1480 b.p. <i>lpp</i> , SNP C178404T (strain 15 NIEG)
Генетическая стабильность Genetic stability	ERIC, RAPD, полногеномное секвенирование ERIC, RAPD, whole genome sequencing	Специфические ERIC и RAPD-профили, набор SNP и других мутаций Specific ERIC and RAPD-profiles, a set of SNPs and other mutations

RD19) и генах, кодирующих липопротеин (RD18), которые выявлены ранее при получении и анализе нуклеотидной последовательности полного генома штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS [24]. Все это указывает на перспективность использования указанных генетических маркеров для оценки аутентичности вакцинного штамма с помощью молекулярно-генетических методов [25].

Далее нами изучена стабильность определенных ранее единичных мутаций у вакцинного штамма: ΔC1169122, G1518663T и C178404T (по

геному штамма *F. tularensis* LVS, GenBank NCBI № CP009694). Для подтверждения уникальности указанных полиморфизмов для вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проведен их поиск в 1025 геномах туляремийного микроба, представленных в базе данных GenBank NCBI. Анализ осуществляли с помощью программы *snippy* v.4.6.01025, сравнивая последовательности в формате *fasta* с референсным геномом штамма *F. tularensis* LVS [26].

Из описанных выше мутаций только C178404T оказалась специфичной для вакцинного штамма.

Мутации ΔC1169122, G1518663T по данным проведенного анализа встречались в геномах штаммов туляремии микроба в 73 и 97 % соответственно. Замена C178404T дополнительно выявлена в геноме штамма *F. tularensis* Tul-161_KZ (GenBank NCBI № JAFCSH010000000), который, по уточненным данным V. Shevtsov *et al.* [27], представляет собой штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранящийся в коллекции Национального научного центра особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева Министерства здравоохранения Республики Казахстан. При картировании ридов *F. tularensis* 15 НИИЭГ на референсный геном *F. tularensis* LVS оказалось, что данная мутация встречалась в 100 % ридов.

Полученные результаты указывают на перспективность использования полиморфизма C178404T при определении аутентичности вакцинного штамма. В связи с этим нами дополнительно к анализу *in silico* проведена оценка стабильности мутации C178404T *in vitro* при исследовании референсных штаммов туляремии микроба различных подвигов, биоваров и субпопуляций: KM3 – подвид *holarctica* биовар *Ery^s*, KM4 – подвид *mediasiatica*, KM5 – подвид *holarctica* биовар *japonica*, KM6 – подвид *tularensis* субпопуляция AII, KM7 – подвид *tularensis* субпопуляция AI, KM8 – подвид *holarctica* биовар *Ery^r* [28] – и штамма подвида *novicida* Utah 112. Амплификацию фрагмента, содержащего мутацию, осуществляли с использованием подобранных с помощью программы GeneRunner 6.5.52. праймеров: snpC-T_f 5'-ACATAATCTTAACCTTGCTCAGC-3'; snpC-T_r 5'-ATCGCTATAGTGGAATGG-3'. Установлено, что у всех изученных штаммов туляремии микроба, кроме вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, вне зависимости от подвида, биовара и субпопуляции, в позиции 178404 (по последовательности *F. tularensis* LVS, GenBank NCBI № CP009694) находился нуклеотид С, тогда как у вакцинного – нуклеотид Т (рисунок).

Полученные данные указывают на перспективность использования описанных выше делеций в регионах RD18/RD19 в совокупности с мутацией C178404T для оценки аутентичности вакцинно-

го штамма с помощью молекулярно-генетических методов.

Для определения генетической стабильности *F. tularensis* 15 НИИЭГ дополнительно к ERIC- и RAPD-типированию представляется перспективным использование полногеномного секвенирования. Предложенный подход при наличии технической возможности выполнения позволит в полной мере оценить изменения в геноме вакцинного штамма и определить его аутентичность в процессе хранения в лиофилизированном состоянии, при анимализации и подготовке последующей серии вакцинного штамма. В дальнейшем предстоит определить место и роль молекулярно-генетических методов на всех технологических этапах производства вакцины туляремии живой.

Производство вакцины туляремии живой осуществляется с использованием лиофилизированной культуры эталонной линии вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, изученной по основным показателям перед началом каждого производственного цикла (таблица). Особо хотелось бы отметить необходимость перед воспроизведением культуры вакцинного штамма на базе предприятия – изготовителя туляремии вакцины его анимализации путем пассажа через организм морской свинки. Как пример, в Омске без проведения анимализации на животных в 2001 г. была изготовлена новая серия штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, которая не соответствовала нормативным требованиям по показателю «Специфическая активность»: завышена концентрация – $250 \cdot 10^{10}$ микробных клеток/мл, снижена жизнеспособность микробных клеток и иммуногенность, что привело к выбраковке серии.

Учитывая вышеизложенное, сотрудниками специализированной лаборатории ГИСК им. Л.А. Тарасевича предложены методические подходы по проведению анимализации вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и рекомендовано включить их в Промышленный регламент производства. Введение данного этапа позволило получить серию вакцинного штамма в 2003 г., которая полностью соответствовала установленным требованиям и ис-

#15NIEG	CAA	TTA	ACC	AAA	AAT	CCA	AAG	TAG	TCA	TCT	TTT	ATG	TAA	[312]
#LVS	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#KM-3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#KM-4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#KM-5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#KM-6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#KM-7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#KM-8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#Utah 112	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]

Анализ фрагмента генома штаммов туляремии микроба различных подвигов, биоваров, субпопуляций и вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, содержащего мутацию C178404T (по нуклеотидной последовательности *F. tularensis* LVS, GenBank NCBI № CP009694):

KM-3 – подвид *holarctica* биовар *Ery^s*; KM-4 – подвид *mediasiatica*; KM-5 – подвид *holarctica* биовар *japonica*; KM-6 – подвид *tularensis* субпопуляция AII; KM-7 – подвид *tularensis* субпопуляция AI; KM-8 – подвид *holarctica* биовар *Ery^r*; Utah 112 – подвид *novicida*

Analysis of the genome fragment of tularemia microbe strains of various subspecies, biovars, subpopulations and vaccine strain *F. tularensis* 15 NIEG containing the C178404T mutation (according to the sequence of *F. tularensis* LVS GenBank NCBI No. CP009694):

KM-3 – subspecies *holarctica* biovar *Ery^s*; KM-4 – subspecies *mediasiatica*; KM-5 – subspecies *holarctica* biovar *japonica*; KM-6 – subspecies *tularensis* subpopulation AII; KM-7 – subspecies *tularensis* subpopulation AI; KM-8 – subspecies *holarctica* biovar *Ery^r*; Utah 112 – subspecies *novicida*

пользовалась при производстве туляреминой живой вакцины с 2004 г.

Для подтверждения стабильности основных свойств вакцинного штамма необходимо предусмотреть проведение его постоянного изучения в течение регламентируемого срока годности (10 лет). В случае выявления изменений нормы показателей, характеризующих штамм как вакцинный, следует принимать своевременные меры для восстановления или подтверждения типичных фенотипических, генетических и иммунобиологических свойств.

Кроме этого, обобщена информация о надлежащих условиях проведения работ и хранении вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Работы по изготовлению вакцинного штамма должны выполняться в производственных помещениях, соответствующих правилам надлежащей производственной практики (GMP). Работы по контролю вакцинного штамма необходимо осуществлять в специальном помещении, где не проводят работы и хранение с использованием иных биологических агентов, в том числе с ПБА I–IV групп патогенности. К работе с вакцинным штаммом допускается квалифицированный персонал, владеющий методами пассивирования, изготовления и контроля вакцинного штамма. Персонал, непосредственно занятый в изготовлении штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, должен быть привит вакциной туляреминой живой и проходить периодические медицинские осмотры в сроки, утвержденные руководителем предприятия – изготовителя препарата.

Ампулы с лиофилизированными эталонной и производственной культурами вакцинного штамма хранятся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III–IV групп патогенности ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России в отдельно выделенном помещении, где не хранятся другие культуры микроорганизмов и иммунобиологические препараты, в морозильной камере при температуре не выше минус 20 °C. Не допускается хранение в одной морозильной камере вакцинных штаммов других видов микроорганизмов. Металлические пеналы и морозильные камеры, в которых хранится эталонная линия вакцинного штамма, должны быть опечатаны печатями сотрудников, осуществляющих оценку качества туляреминой вакцины живой, и Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III–IV групп патогенности.

Таким образом, проведенный ретроспективный анализ материалов о культурах вакцинного штамма туляреминого микроба с 1940-х по 2013 год и экспериментальные данные, полученные в последние годы, позволили дополнить новыми сведениями единые требования изготовления, изучения, поддержания, хранения и движения (выдачи) вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ к организациям, осуществляющим производство и выпуск препаратов для профилактики и диагностики туляремии, выполняющим контроль их качества и безопасности,

а также к специалистам учреждений, проводящих научные исследования по разработке профилактических и диагностических противотуляреминых препаратов.

На основании проведенных исследований и полученных результатов коллективом авторов (ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России, ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора) разработан проект методических рекомендаций федерального уровня «Вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ: порядок обращения».

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Список литературы

1. Гайский Н.А., Эльберт Б.Я. О механизме инфекции и иммунитета при экспериментальной туляремии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1941; 12:37–42.
2. Гайский Н.А., Хижинская О.П. Первые итоги применения живой туляреминой вакцины. *Известия Иркутского государственного противочумного института Сибири и Дальнего Востока*. 1946; 6:10–5.
3. Сиротюк Л.В. Биологические свойства туляреминых вакцинных штаммов НИИЭГ. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1964; 10:116–20.
4. Олсуфьев Н.Г., Емельянова О.С., Угловой Г.П., Салтыков Р.А., Сиротюк Л.В., Сильченко В.С., Капцын М.С., Левачева З.А., Кочуркова С.А., Бобылкова Т.В., Баранчиков В.Д., Веденеева Е.В., Егорова Л.С., Иванов В.С., Баранова Н.К., Денисова В.Д., Шельмовер Р.С., Хомутова Н.В., Кудерьб Г.Г., Панышева М.Д., Пелехова К.И., Красицкая З.И., Назарова М.Г., Красникова Е.И., Штучная А.А., Владимиров А.И., Коржева В.С. Сравнительное испытание на людях вариантов вакцинного туляреминого штамма 15 Гайского. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1971; 5:55–7.
5. Олсуфьев Н.Г. Итоги и перспективы изучения и применения в СССР живой туляреминой вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1967; 5:3–10.
6. Pasetti M.F., Cuberos L., Horn T.L., Shearer J.D., Matthews S.J., House R.V., Szein M.B. An improved *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) is well tolerated and highly immunogenic when administered to rabbits in escalating doses using various immunization routes. *Vaccine*. 2008; 26(14):1773–85.
7. Barry E.M., Cole L.E., Santiago A.E. Vaccines against tularemia. *Hum. Vaccin.* 2009; 5(12):832–8. DOI: 10.4161/hv.10297.
8. Marohn M.E., Barry E.M. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals. *Vaccine*. 2013; 31(35):3485–91. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.05.096.
9. Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Олефир Ю.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 2:107–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-107-110.
10. WHO Technical Report Series No. 927. WHO Expert Committee On Biological Standardization (54th report). Geneva, 2005. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9241209275>.
11. de la Puente-Redondo V.A., del Blanco N.G., Gutiérrez-Martín C.B., García-Peña F.J., Rodríguez Ferri E.F. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(3):1016–22. DOI: 10.1128/JCM.38.3.1016-1022.2000.
12. Sunagar R., Kumar S., Franz B.J., Gosselin E.J. Tularemia vaccine development: paralysis or progress? *Vaccine* (Auckl). 2016; 6:9–23. DOI: 10.2147/VDT.S85545.
13. Reed D.S., Smith L.P., Cole K.S., Santiago A.E., Mann B.J., Barry E.M. Live attenuated mutants of *Francisella tularensis* protect rabbits against aerosol challenge with a virulent type A strain. *Infect. Immun.* 2014; 82(5):2098–105. DOI: 10.1128/IAI.01498-14.

14. WHO good manufacturing practices for biological products, Annex 2, TRS No. 999. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/publications/m/item/annex-2-trs-no-999-WHO-gmp-for-biological-products>.
15. Руководства ИЧН для фармацевтической отрасли. Качество. СПб.: ЦОП «Профессия»; 2017. 768 с.
16. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.
17. Соловьев Е.А., Саяпина Л.В., Осина Н.А., Давыдов Д.С., Бондарев В.П. Характеристика фенотипических и генетических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ с длительными сроками хранения. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4:91–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-91-95.
18. Саяпина Л.В., Соловьев Е.А., Горяев А.А., Бондарев В.П. Изучение иммунобиологических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в условиях длительного хранения. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 2:87–91. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-87-91.
19. Саяпина Л.В., Хорева И.И., Байдалова Н.П., Горяев А.А., Давыдов Д.С., Поступайло В.Б., Меркулов В.А. Оценка остаточной вирулентности вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ по данным многолетних наблюдений. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 1:98–102. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-98-102.
20. Мещерякова И.С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика (к 80-летию создания первой туляреминой лаборатории в России). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 2:17–22.
21. Избанова У.А., Куница Т.Н., Лухнова Л.Ю. Достижения в области специфической профилактики туляремии. *Medicine (Almaty)*. 2016; 10:49–59.
22. Stinson E., Smith L.P., Cole K.S., Barry E.M., Reed D.S. Respiratory and oral vaccination improves protection conferred by the live vaccine strain against pneumonic tularemia in the rabbit model. *Pathog. Dis.* 2016; 74(7):ftw079. DOI: 10.1093/femspd/ftw079.
23. O'Malley K.J., Bowling J.D., Stinson E., Cole K.S., Mann B.J., Namjoshi P., Hazlett K.R.O., Barry E.M., Reed D.S. Aerosol prime-boost vaccination provides strong protection in outbred rabbits against virulent type A *Francisella tularensis*. *PLoS One*. 2018; 13(10):e0205928. DOI: 10.1371/journal.pone.0205928.
24. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Byström M., Forsman M., Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11):3903–8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005.
25. Нарышкина Е.А., Краснов Я.М., Альхова Ж.В., Баданин Д.В., Осин А.В., Ляшова О.Ю., Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Меркулов В.А., Олефир Ю.В., Кутырев В.В. Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:91–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97.
26. Seemann T. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. 2015. [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/tseemann/snippy?ysclid=l8bilbj7p802266956>.
27. Shevtsov V., Kairzhanova A., Shevtsov A., Shustov A., Kalendar R., Abdrakhmanov S., Lukhnova L., Izbanova U., Ramankulov Y., Vergnaud G. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15(5):e0009419. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009419.
28. Осина Н.А., Уткин Д.В., Сеничкина А.М., Бугоркова Т.В., Кутырев В.В. Набор штаммов бактерий вида *Francisella tularensis* для получения комплекта контрольных ДНК препаратов, комплект ДНК препаратов для генно-диагностических исследований. Патент РФ № 2443772, опубл. 27.02.2012. Бюл. № 6.
29. Shtuchnaya A.A., Vladimirova A.I., Korzheva V.S. [Comparative human trial of variants of Gaisky tularemia vaccine strain 15]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1971; (5):55–7.
30. Olsuf'ev N.G. [Results and prospects of studying and using the live tularemia vaccine in the USSR]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1967; (5):3–10.
31. Pasetti M.F., Cuberos L., Horn T.L., Shearer J.D., Matthews S.J., House R.V., Sztein M.B. An improved *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) is well tolerated and highly immunogenic when administered to rabbits in escalating doses using various immunization routes. *Vaccine*. 2008; 26(14):1773–85.
32. Barry E.M., Cole L.E., Santiago A.E. Vaccines against tularemia. *Hum. Vaccin.* 2009; 5(12):832–8. DOI: 10.4161/hv.10297.
33. Marohn M.E., Barry E.M. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals. *Vaccine*. 2013; 31(35):3485–91. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.05.096.
34. Sayapina L.V., Bondarev V.P., Olefir Yu.V. [The current state of vaccinal prevention of particularly dangerous infections]. *Problemny Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (2):107–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-107-110.
35. WHO Technical Report Series No. 927. WHO Expert Committee on Biological Standardization (54th report). Geneva, 2005. [Internet]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9241209275>.
36. de la Puente-Redondo V.A., del Blanco N.G., Gutiérrez-Martín C.B., García-Peña F.J., Rodríguez Ferri E.F. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(3):1016–22. DOI: 10.1128/JCM.38.3.1016-1022.2000.
37. Sunagar R., Kumar S., Franz B.J., Gosselin E.J. Tularemia vaccine development: paralysis or progress? *Vaccine (Auckl)*. 2016; 6:9–23. DOI: 10.2147/VDI.S85545.
38. Reed D.S., Smith L.P., Cole K.S., Santiago A.E., Mann B.J., Barry E.M. Live attenuated mutants of *Francisella tularensis* protect rabbits against aerosol challenge with a virulent type A strain. *Infect. Immun.* 2014; 82(5):2098–105. DOI: 10.1128/IAI.01498-14.
39. WHO good manufacturing practices for biological products, Annex 2, TRS No. 999. [Internet]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/annex-2-trs-no-999-WHO-gmp-for-biological-products>.
40. [ICH Guidelines for the Pharmaceutical Industry. Quality]. St. Petersburg; 2017. 768 p.
41. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV ed. Moscow; 2018.
42. Solov'ev E.A., Sayapina L.V., Osina N.A., Davydov D.S., Bondarev V.P. [Characterization of phenotypic and genetic properties of *Francisella tularensis* vaccine strain 15 NIEG with long shelf life]. *Problemny Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (4):91–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-91-95.
43. Sayapina L.V., Solov'ev E.A., Goryaev A.A., Bondarev V.P. [Study of the immunobiological properties of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG under long-term storage conditions]. *Problemny Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; 2:87–91. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-87-91.
44. Sayapina L.V., Khoreva I.I., Baidalova N.P., Goryaev A.A., Davydov D.S., Postupailo V.B., Merkulov V.A. [Evaluation of the residual virulence of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG based on long-term observations]. *Problemny Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (1):98–102. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-98-102.
45. Meshcheryakova I.S. [Tularemia: modern epidemiology and vaccination (on the occasion of the 80th anniversary of the creation of the first tularemia laboratory in Russia)]. *Epidemiologia I Vaktsynoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2010; (2):17–22.
46. Izbanova U.A., Kunitsa T.N., Lukhnova L.Yu. [Advances in specific prevention of tularemia]. *Medicine (Almaty)*. 2016; (10):49–59.
47. Stinson E., Smith L.P., Cole K.S., Barry E.M., Reed D.S. Respiratory and oral vaccination improves protection conferred by the live vaccine strain against pneumonic tularemia in the rabbit model. *Pathog. Dis.* 2016; 74(7):ftw079. DOI: 10.1093/femspd/ftw079.
48. O'Malley K.J., Bowling J.D., Stinson E., Cole K.S., Mann B.J., Namjoshi P., Hazlett K.R.O., Barry E.M., Reed D.S. Aerosol prime-boost vaccination provides strong protection in outbred rabbits against virulent type A *Francisella tularensis*. *PLoS One*. 2018; 13(10):e0205928. DOI: 10.1371/journal.pone.0205928.
49. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Byström M., Forsman M., Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11):3903–8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005.

References

1. Gaisky N.A., Elbert B.Ya. [On the mechanism of infection and immunity in experimental tularemia]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1941; (12):37–42.
2. Gaisky N.A., Khizhinskaya O.P. [The first results of the use of live tularemia vaccine]. *Izvestiya Irkutskogo Gosudarstvennogo Protivochumnogo Instituta Sibiri i Dal'nego Vostoka [Proceedings of the Irkutsk State Anti-Plague Institute of Siberia and Far East]*. 1946; (6):10–5.
3. Sirotyuk L.V. [Biological properties of tularemia vaccine strains NIEG]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1964; (10):116–20.
4. Olsuf'ev N.G., Emelyanova O.S., Uglovoi G.P., Saltykov R.A., Sirotyuk L.V., Sil'chenko V.S., Kaptsyn M.S., Levacheva Z.A., Kochurkova S.A., Bobylkova T.V., Baranchikov V.D., Vedeneva E.V., Egorov L.S., Ivanov V.S., Baranova N.K., Denisova V.D., Shel'mover R.S., Khomutova N.V., Kutseryb G.G., Panysheva M.D., Pelekhova K.I., Krasitskaya Z.I., Nazarova M.G., Krasnikova E.I.,

25. Naryshkina E.A., Krasnov Ya.M., Al'khova Zh.V., Badanin D.V., Osin A.V., Lyashova O.Yu., Sayapina L.V., Bondarev V.P., Merkulov V.A., Olefir Yu.V., Kutyrev V.V. [Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of *Francisella tularensis* vaccine strain 15 NIEG]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2020; (2):91–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97.

26. Seemann T Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. 2015. [Internet]. Available from: <https://github.com/tseemann/snippy?ysclid=l8bilbj7rp802266956>.

27. Shevtsov V., Kairzhanova A., Shevtsov A., Shustov A., Kalendar R., Abdrakhmanov S., Lukhnova L., Izbanova U., Ramankulov Y., Vergnaud G. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15(5):e0009419. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009419.

28. Osina N.A., Utkin D.V., Senichkina A.M., Bugorkova T.V., Kutyrev V.V. [A panel of bacterial strains of the *Francisella tularensis* species for obtaining a set of control DNA preparations, a set of DNA preparations for genetic diagnostic studies]. RF patent No. 2443772, publ. 02/27/2012. Bull. No. 6.

Authors:

Sayapina L.V., Davydov D.S., Bondarev V.P. Scientific Center on Expertise of Medical Application Products. Building 2, 8, Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

Osina N.A., Naryshkina E.A., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Саяпина Л.В., Давыдов Д.С., Бондарев В.П. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский б-р, 8, стр. 2.

Осина Н.А., Нарышкина Е.А., Федоров А.В., Краснов Я.М. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-145-150

УДК 616.98:579.841.95

А.К. Сингеева, А.С. Остяк, Е.С. Куликалова, А.В. Мазепа, К.В. Наумова,
С.В. Балахонов**Эффективность применения MALDI-ToF масс-спектрометрии
при идентификации штаммов *Francisella tularensis****ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск,
Российская Федерация*

Цель исследования – оценить эффективность применения MALDI-ToF масс-спектрометрии при идентификации коллекционных и свежевыделенных штаммов возбудителя туляремии с использованием базы данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I–II групп патогенности для программы MALDI Biotyper». **Материалы и методы.** Исследовано 142 штамма *Francisella tularensis*, в числе которых 59 коллекционных и 83 свежевыделенных. Для их идентификации использовали бактериологический, молекулярно-генетический и масс-спектрометрический методы исследования. Сбор масс-спектров, анализ, генерация и расширение референсных библиотек выполнены на масс-анализаторе Microflex LT с использованием пакета программ FlexControl v. 3.3, FlexAnalysis v. 3.3, MALDI Biotyper 3.0. Кластерный анализ осуществлен в программе BioNumerics 7.6. **Результаты и обсуждение.** Оценена возможность идентификации возбудителя туляремии с помощью расширенной базы данных MALDI Biotyper 3.0 «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I–II групп патогенности для программы MALDI Biotyper». При идентификации до уровня вида результаты масс-спектрометрии коллекционных и свежевыделенных штаммов показали 91,5 и 97,6 % достоверности соответственно. В определении родовой принадлежности надежность идентификации составила 100 %. Таким образом, метод MALDI-ToF масс-спектрометрии позволяет достоверно проводить видовую и родовую идентификацию штаммов *F. tularensis*. На основании кластерного анализа 66 штаммов *F. tularensis* в программе BioNumerics 7.6. с использованием Pearson correlation по алгоритму UPGMA оценена возможность подвидовой дифференциации. В связи со схожестью белковых профилей штаммов *F. tularensis* четкой дифференциации на подвиды добиться не удалось. Для успешного проведения подвидовой дифференциации необходимо использовать другие варианты подготовки образцов, приборы нового поколения с более высокой разрешающей способностью, а также применять дополнительные подходы и инструменты анализа.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, масс-спектрометрия, MALDI-ToF, внутривидовая дифференциация.

Корреспондирующий автор: Сингеева Аюна Константиновна, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Для цитирования: Сингеева А.К., Остяк А.С., Куликалова Е.С., Мазепа А.В., Наумова К.В., Балахонов С.В. Эффективность применения MALDI-ToF масс-спектрометрии при идентификации штаммов *Francisella tularensis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 3:145–150. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-145-150

Поступила 02.06.2020. Отправлена на доработку 11.10.2021. Принята к публ. 25.08.2022.

A.K. Syngееva, A.S. Ostyak, E.S. Kulikalova, A.V. Mazepa, K.V. Naumova, S.V. Balakhonov

**The Effectiveness of MALDI-ToF Mass Spectrometry in Identification
of *Francisella tularensis* Strains***Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation*

Abstract. The aim of the study was to evaluate the effectiveness of MALDI-ToF mass spectrometry in the identification of collection and newly isolated strains of tularemia pathogen using the database “Protein profiles of mass spectra of microorganisms belonging to I–II pathogenicity groups for the MALDI Biotyper software”. **Materials and methods.** We investigated 142 strains of *Francisella tularensis*, including 59 collection strains and 83 newly isolated ones. Bacteriological, molecular-genetic and proteomic research methods were used to identify them. The acquisition of mass spectra, analysis, generation and expansion of reference libraries were performed on a mass analyzer “Microflex LT” using FlexControl v. 3.3, FlexAnalysis v. 3.3, and MALDI Biotyper 3.0 software packages. The cluster analysis was performed using the BioNumerics 7.6 software. **Results and discussion.** The possibility of identifying tularemia pathogen has been assessed using the extended database for MALDI Biotyper 3.0 “Protein profiles of mass spectra of microorganisms belonging to I–II pathogenicity groups for the MALDI Biotyper software”. During identification to the species level, the significance of mass spectrometry results for collection strains and newly isolated ones was 91.5 % and 97.6 %, respectively. In determining the genus appurtenance, the reliability of identification was 100 %. Thus, the MALDI-ToF mass spectrometry method allows for accurate species and genus identification of *F. tularensis* strains. Based on the cluster analysis of 66 *F. tularensis* strains in BioNumerics 7.6 software using «Pearson correlation» and the UPGMA algorithm, the possibility of subspecies differentiation has been evaluated. Due to the similarity of protein profiles of *F. tularensis* strains, a clear differentiation into subspecies could not be achieved. It is necessary to use other options for sample preparation, new generation devices with higher resolution, as well as apply additional approaches and analysis tools for successful subspecific differentiation.

Key words: *Francisella tularensis*, mass spectrometry, MALDI-TOF, intraspecific differentiation.

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

Corresponding author: Ayuna K. Syngeeva, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Syngeeva A.K., Ostyak A.S., Kulikalova E.S., Mazepa A.V., Naumova K.V., Balakhonov S.V. The Effectiveness of MALDI-ToF Mass Spectrometry in Identification of *Francisella tularensis* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:145–150. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-145-150

Received 02.06.2020. Revised 11.10.2021. Accepted 25.08.2022.

Syngeeva A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2995-4452>

Kulikalova E.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7034-5125>

Ostyak A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9391-6779>

Mazepa A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0843-4757>

Naumova K.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5250-7530>

Balakhonov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Важным разделом эпидемиологического надзора за туляремией в России является совершенствование лабораторной диагностики с использованием новых методических приемов обнаружения возбудителя в исследуемом материале [1]. Так, с 2014 г. в лабораторную практику внедрен метод времяпролетной масс-спектрометрии (времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI-ToF MS), позволяющий идентифицировать бактерии путем сравнения масс-спектров белков исследуемых бактериальных клеток с помощью референсных эталонных спектров, хранящихся в базе данных (MP 4.2.0089-14). MALDI-ToF MS уже зарекомендовал себя в микробиологической практике как быстрый, надежный и достоверный метод для идентификации возбудителей особо опасных инфекций (ООИ) [2]. Поскольку в базу данных MALDI Biotyper 3.0 не входили спектры возбудителей I–II групп патогенности, в 2016 г. противочумными институтами России проведено ее расширение путем добавления референсных белковых спектров штаммов опасных патогенов. В результате импортирована база данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I–II групп патогенности для программы MALDI Biotyper» (свидетельство от 15.03.2016 № 2016620345), позволяющая проводить ускоренную идентификацию туляремии, в которую входит 35 референсных спектров *Francisella tularensis*, а также 6 спектров близкородственного вида *F. philomiragia*. Однако с тех пор опубликовано мало статей, отражающих практический опыт применения этого метода и оценки эффективности идентификации возбудителя туляремии с использованием обновленной базы данных.

Цель исследования – оценить эффективность применения MALDI-ToF масс-спектрометрии при идентификации коллекционных и свежевыделенных штаммов возбудителя туляремии с применением базы данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I–II групп патогенности для программы MALDI Biotyper».

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. Исследовано 142 штамма *F. tularensis*, в числе которых 59 коллекционных и 83 свежевыделенных на курируемой Иркутским противочумным институтом территории.

Биохимические свойства для определения подвидовой принадлежности изучали путем посева штаммов на среды с глицерином и цитруллином. Культивировали в течение двух суток при 37 °C.

Определение биовара туляремийного микроба выполняли путем посева 0,1 мл взвеси 10^9 м.к. на чашку Петри с Ft-агаром с последующим применением диско-диффузионного метода (эритромицин). Через двое суток по наличию зоны задержки роста производили учет результатов.

Для масс-спектрометрического исследования использовали 24-часовые культуры, выращенные при 37 °C на FT-агаре (pH 7,0). Подготовку проб выполняли согласно методическим рекомендациям MP 4.2.0089-14 (протокол идентификации для неспорообразующих бактерий).

Молекулярно-генетический анализ. Выделение ДНК двухсуточных агаровых культур *F. tularensis* осуществляли коммерческим набором «РИБО-преп» (ЦНИИ эпидемиологии, Россия).

Выявление видоспецифичного гена *iglBC F. tularensis* проводилось с использованием тест-системы «Набор реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени» (Российский противочумный институт «Микроб», Россия).

Детекцию генов *pdpA* и *pdpD* для определения подвида туляремийного микроба осуществляли с использованием универсальных коммерческих наборов для амплификации ДНК («Синтол», Россия) и ген-специфичных праймеров [3].

Масс-спектрометрический анализ. Спектры собирали в автоматическом режиме на масс-спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, США) с использованием программы Flex Control (v. 3.3, build 108), при функционировании прибора в линейном позитивном режиме со следующими параметрами: напряжение Ion Source 1 (IS1) – 20 кВ, Ion Source 2 (IS2) – 18,05 кВ, напряжение на фокусирующей линзе – 6 кВ, частота азотного лазера – 60 Гц. Параметры работы прибора оптимизировали для диапазона отношения массы иона к его заряду (m/z) от 2000 до 20000. Каждый спектр получали путем суммирования 6 одиночных спектров (240 импульсов лазера). Для получения референсных библиотек спектров образец исследовали в 20 повторах, для идентификации – в 5. Анализ спектров, генерацию, расширение референсных библиотек и идентификацию выполняли с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, США).

Таксономическая принадлежность микроорганизма и достоверность идентификации методом MALDI-ToF MS оценивалась в соответствии со значением индекса совпадения (score value, SV). Значение $SV \geq 2,3$ соответствовало достоверной идентификации до вида; SV менее 2,299, но более

2,000 – достоверной идентификации до рода, вероятной до вида, значение SV в диапазоне 1,7–1,999 рассматривали как вероятную идентификацию до рода и менее 1,7 – недостоверный результат.

Кластерный анализ. Кластерный анализ проведен в программах MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, США) и BioNumerics v. 7.6 (Applied Maths, Бельгия).

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы исследованы 59 коллекционных штаммов *F. tularensis*, выделенных с 1937 по 2014 год, в пятикратной повторности. Белковое профилирование с применением MALDI-ToF MS позволило провести достоверную идентификацию до вида *F. tularensis* для 54 штаммов (SV 2,445–2,848), а для пяти – достоверную идентификацию до рода, вероятную до вида (SV 2,195–2,292) (табл. 1).

Также в ходе мониторинговой деятельности института в период с 2015 по 2021 год выделено 83 штамма возбудителя туляремии, среди которых обнаружено 34 штамма подвида *mediasiatica*, циркулирующих преимущественно на территориях Алтайского края, Республики Алтай и Красноярского края. Внутривидовая характеристика штаммов получена в результате традиционных лабораторных тестов (ферментация цитруллина и глицирина; выявление генов *pdpA*, *pdpD*). Далее методом MALDI-ToF MS достоверно идентифицированы до вида *F. tularensis* 48 штаммов голарктического подвида, один – до рода. Из группы штаммов среднеазиатского подвида 33 идентифицированы до вида, а один – до рода (табл. 2).

Таким образом, при идентификации до уровня вида результаты масс-спектрометрии коллекционных и свежесделанных штаммов показали 91,5 и 97,6 % совпадение соответственно. В определении

Таблица 1 / Table 1

Результаты масс-спектрометрической идентификации коллекционных штаммов *F. tularensis*, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока с 1941 по 2014 год (N=59)

The *F. tularensis* collection strains isolated in Siberia and Far East between 1941 and 2014 (N=59), mass spectrometric identification results

Результат идентификации Identification result	Территория Territory	Количество исследованных штаммов Number of studied strains	Значение SV SV value
Достоверная идентификация до вида Reliable identification up to the species	Алтайский край Altai Territory	7	2,531–2,647
	Забайкальский край Trans-Baikal Territory	4	2,569–2,637
	Иркутская область Irkutsk Region	5	2,365–2,763
	Камчатский край Kamchatka Territory	1	2,627
	Кемеровская область Kemerovo Region	1	2,712
	Красноярский край Krasnoyarsk Territory	8	2,509–2,660
	Новосибирская область Novosibirsk Region	2	2,342–2,390
	Республика Алтай Altai Republic	1	2,580
	Республика Бурятия Buryat Republic	9	2,428–2,731
	Республика Тыва Tyva Republic	1	2,538
	Республика Якутия Yakutia Republic	2	2,622–2,641
	Сахалинская область Sakhalin Region	5	2,586–2,835
	Тюменская область Tyumen Region	1	2,666
Достоверная идентификация до рода Reliable identification up to the genus	Хабаровский край Khabarovsk Territory	7	2,491–2,739
	Республика Бурятия Buryat Republic	2	2,202–2,253
	Забайкальский край Trans-Baikal Territory	2	2,243–2,292
	Узбекистан Uzbekistan	1	2,195

Таблица 2 / Table 2

Результаты масс-спектрометрической идентификации свежевыведенных штаммов *F. tularensis*, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока с 2015 по 2021 год (N=83)

The newly *F. tularensis* strains isolated in Siberia and the Far East from 2015 to 2021 (N=83), mass spectrometric identification results

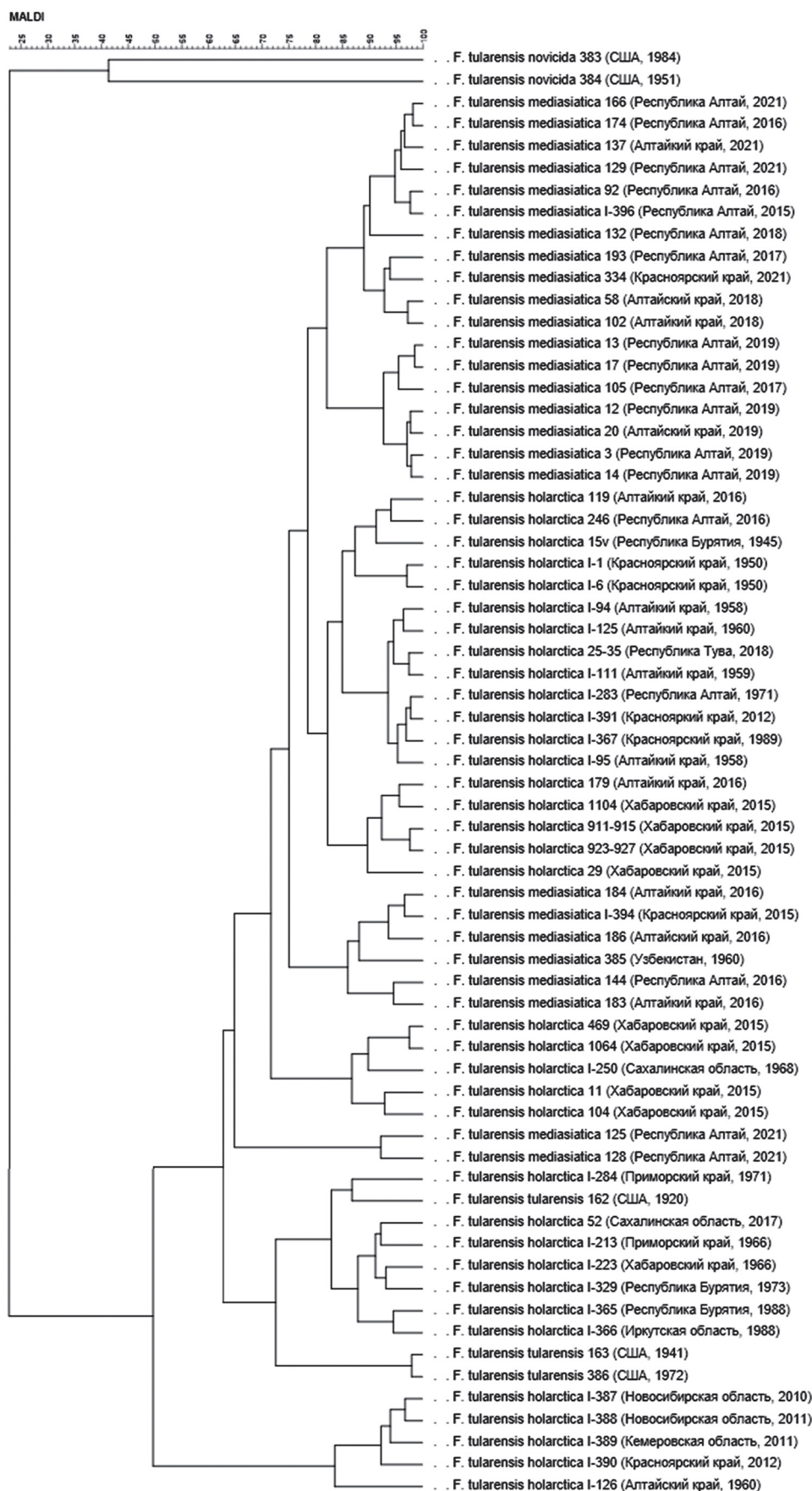
Результат идентификации Identification result	Территория Territory	<i>F. tularensis</i> spp.	Количество исследованных штаммов Number of studied strains	Значение SV SV value
Достоверная идентификация до вида Reliable identification up to the species	Алтайский край Altai Territory	<i>holarctica</i>	8	2,389–2,631
		<i>mediasiatica</i>	10	2,388–2,579
	Красноярский край Krasnoyarsk Territory	<i>mediasiatica</i>	2	2,377–2,452
	Республика Алтай Altai Republic	<i>holarctica</i>	3	2,311–2,633
		<i>mediasiatica</i>	21	2,372–2,620
	Республика Тыва Tyva Republic	<i>holarctica</i>	1	2,559
	Сахалинская область Sakhalin Region	<i>holarctica</i>	1	2,633
Достоверная идентификация до рода Reliable identification up to the genus	Хабаровский край Khabarovsk Territory	<i>holarctica</i>	35	2,380–2,670
	Приморский край Primorsky Territory	<i>holarctica</i>	1	2,240
	Республика Алтай Altai Republic	<i>mediasiatica</i>	1	2,124

родовой принадлежности – 100 %. Данные показатели достаточно высоки и указывают на надежную идентификацию. Однако следует отметить меньшую информативность и точность масс-спектрометрии при изучении коллекционных штаммов. Среди возможных причин может быть неполное восстановление свойств патогена после хранения (длительное хранение в лиофилизированном виде), различные условия культивирования штаммов, которые использованы для дополнения базы данных масс-анализатора и анализируемых штаммов, а также недостаточная представленность референсными спектрами туляремиального микроба, выделенного с определенных территорий, в частности Забайкальского края, Республики Бурятия и ближнего зарубежья. Для преодоления обнаруженных расхождений следует стандартизировать условия культивирования в разных лабораториях, а также дополнить базу данных, инсталлированную в прибор Microflex LT. Вопрос о снижении точности идентификации штаммов после хранения требует дальнейшего уточнения.

Для оценки возможности совершенствования масс-спектрометрии при внутривидовой дифференциации проведен кластерный анализ в программе BioNumerics 7.6. для выборки из 66 спектров *F. tularensis* подвидов *holarctica* (35), *mediasiatica* (26), *tularensis* (3) и *novicida* (2). В данной программе тестировались разные алгоритмы сравнения масс-спектров: как на основе пиков, так и кривых (UPGMA, Ward, Single linkage, Complete linkage). Наилучший результат достигнут с использованием Pearson correlation по алгоритму UPGMA, однако четкого разделения на подвиды добиться не удалось (рисунок), что наглядно демонстрирует сходство белковых профилей разных подвидов туляремиального микроба, по край-

ней мере, после ионизации. В то же время следует отметить, что все штаммы разделились на два кластера. В первый вошли штаммы подвида *novicida*, которые при любых алгоритмах построения филогенетического древа всегда кластеризовались отдельно. Второй кластер включил в себя три остальных подвида, которые в некоторой степени объединились в определенные подгруппы. Можно заключить, что в настоящее время идентификация *F. tularensis* методом MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе Microflex LT по стандартной схеме наиболее надежно достигается до видового уровня, а сложности внутривидового типирования являются ограничением этого метода.

В литературе встречаются исследования, свидетельствующие об успешном применении MALDI-ToF масс-спектрометрии в определении подвида или даже биовара [4–8]. Например, применяя разные условия культивирования и подготовки образцов E. Siebold *et al.* (2010 г.) и O. Karatuna *et al.* (2014 г.) достоверно определили подвиговую принадлежность 45 и 60 штаммов туляремиального микроба соответственно [4, 5]. M.T. Gekenidis *et al.* (2014 г.) путем расщепления белка до трипептических пептидов удалось повысить разрешающую способность дифференцирования сальмонелл до уровня подвигов [6]. Также, используя в качестве матрицы (Е)-пропил-циано-4-гидроксициннамилат вместо стандартной (альфа-циано-4-гидроксикоричной) кислоты, удалось достоверно дифференцировать биовары метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного золотистого стафилококка [7]. М.В. Цимбалитова *et al.* (2017 г.), с применением прибора Autoflex speed III (Druker Daltonics, США) и экстракцией белков этиловым спиртом и муравьиной кислотой, обнаружи-



Кластерный анализ спектров штаммов *F. tularensis* в программе BioNumerics v. 7.6 с использованием Pearson correlation по алгоритму UPGMA

The cluster analysis of *F. tularensis* strain spectra in BioNumerics v. 7.6 using “Pearson correlation” and the UPGMA algorithm

ли уникальные пики, характерные для вирулентных штаммов туляремии микроба [8]. Также имеется более мягкий способ ионизации, оказывающий менее разрушающее воздействие на анализируемое вещество, такой как surface-enhanced laser desorption/ionization (лазерная десорбция/ионизация с усилением поверхности, SELDI-ToF MS) [9], с помощью которого неоднократно проводилась достоверная видовая идентификация. Из представленных данных видно, что для повышения разрешающей способности MALDI-ToF масс-спектрометрии авторами чаще всего применялся иной способ подготовки образцов, использовалась другая матрица или прибор с более высокой разрешающей способностью. В итоге, по всей видимости, ими были получены более информативные спектры.

Таким образом, с помощью стандартизованного протокола оценена эффективность видовой идентификации и внутривидовой дифференциации возбудителя туляремии методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. С применением обновленной базы данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I–II групп патогенности для программы MALDI Biotyper» данный метод в системе лабораторной диагностики туляремии позволяет с высокой надежностью проводить видовую и родовую идентификацию патогена. Для увеличения точности, возможности внутривидовой дифференциации и дальнейшего развития автоматизированной идентификации микроорганизмов, помимо расширения выборки эталонных спектров, необходимо использование приборов нового поколения и применение дополнительных подходов и инструментов анализа.

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.: Шико; 2013. 560 с.
2. Балахонов С.В., Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Куликалова Е.С., Остяк А.С. MALDI-ToF масс-спектрометрическое определение видовой принадлежности патогенов в совершенствовании эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями. *Бактериология*. 2016; 1(1):88–94. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-88-94.
3. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C., Klose K.E., Cheung K.K., Roberts M.J., Ludu J.S., Letendre G.W., Meierovics A.I., Stephens G., Elkins K.L. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J. Bacteriol.* 2004; 186(19):6430–6. DOI: 10.1128/JB.186.19.6430-6436.2004.
4. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Splettstoesser W. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1061–9. DOI: 10.1128/JCM.01953-09.
5. Karatuna O., Celebi B., Can S., Akyar I., Kilic S. The use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in the identification of *Francisella tularensis*. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2016; 16(2):132–8. DOI: 10.17305/bjbm.2016.894.
6. Gekenidis M.-T., Studer P., Wüthrich S., Brunisholz R., Drissner D. Beyond the matrix-assisted laser desorption/ionization

(MALDI) biotyping workflow: in search of microorganism-specific tryptic peptides enabling discrimination of subspecies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(14):4234–41. DOI: 10.1128/AEM.00740-14.

7. Gao W., Li B., Ling L., Zhang L., Yu S. MALDI-ToF MS method for differentiation of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using (E)-Propyl α-cyano-4-Hydroxyl cinnamylate. *Talanta*. 2022; 244:123405. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123405.

8. Цимбалистова М.В., Павлович Н.В., Аронова Н.В., Чайка И.А., Чайка С.О., Водопьянов А.С. Масс-спектрометрический анализ природных и антиген-измененных штаммов туляремии микроба. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 4:92–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-92-96.

9. Seibold E., Bogumil R., Vorderwülbecke S., Al Dahouk S., Buckendahl A., Tomaso H., Splettstoesser W. Optimized application of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight MS to differentiate *Francisella tularensis* at the level of subspecies and individual strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2017; 49(3):364–73. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00216.x.

References

1. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: Shiko; 2013. 560 p.
2. Balakhonov S.V., Mironova L.V., Afanas'ev M.V., Kulikalova E.S., Ostyak A.S. [MALDI-ToF mass spectrometric identification of pathogen species in improving the epidemiological surveillance of dangerous infectious diseases]. *Bakteriologia [Bacteriology]*. 2016; 1(1):88–94. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-88-94.
3. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C., Klose K.E., Cheung K.K., Roberts M.J., Ludu J.S., Letendre G.W., Meierovics A.I., Stephens G., Elkins K.L. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J. Bacteriol.* 2004; 186(19):6430–6. DOI: 10.1128/JB.186.19.6430-6436.2004.
4. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Splettstoesser W. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1061–9. DOI: 10.1128/JCM.01953-09.
5. Karatuna O., Celebi B., Can S., Akyar I., Kilic S. The use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in the identification of *Francisella tularensis*. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2016; 16(2):132–8. DOI: 10.17305/bjbm.2016.894.
6. Gekenidis M.-T., Studer P., Wüthrich S., Brunisholz R., Drissner D. Beyond the matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) biotyping workflow: in search of microorganism-specific tryptic peptides enabling discrimination of subspecies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(14):4234–41. DOI: 10.1128/AEM.00740-14.
7. Gao W., Li B., Ling L., Zhang L., Yu S. MALDI-ToF MS method for differentiation of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using (E)-Propyl α-cyano-4-Hydroxyl cinnamylate. *Talanta*. 2022; 244:123405. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123405.
8. Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V., Aronova N.V., Chaika I.A., Chaika S.O., Vodop'yanov A.S. [Mass-spectrometric analysis of natural and antigen-altered strains of the tularemia microbe]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (4):92–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-92-96.
9. Seibold E., Bogumil R., Vorderwülbecke S., Al Dahouk S., Buckendahl A., Tomaso H., Splettstoesser W. Optimized application of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight MS to differentiate *Francisella tularensis* at the level of subspecies and individual strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2017; 49(3):364–73. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00216.x.

Authors:

Syngeeva A.K., Ostyak A.S., Kulikalova E.S., Mazepa A.V., Naumova K.V., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Сынгеева А.К., Остяк А.С., Куликалова Е.С., Мазепа А.В., Наумова К.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.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-151-157

УДК 616.932:579.25

Н.Б. Челдышова, З.Л. Девдариани

Сравнительный анализ экспрессии основных генов вирулентности у различных штаммов *Vibrio cholerae* O1

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

Цель – сравнительное изучение экспрессии основных генов вирулентности у штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара, типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор. **Материалы и методы.** В качестве модельных использовали природные токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 классического биовара (J89, Пакистан, 1969 г.), типичного (M-887, Астрахань, 1970 г.) и генетически измененного (301, Таганрог, 2011 г.) штаммов биовара Эль Тор. Штаммы выращивали в оптимальных для продукции холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей условиях. Исследование роста штаммов проводили на бульоне LB при комнатной температуре с определением количества клеток на спектрофотометре Biowave DNA (Biochrome Ltd., Великобритания). Определение экспрессии генов осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. **Результаты и обсуждение.** Изучена экспрессия структурных (*ctxA*, *tcpA*) и регуляторных (*toxR*, *toxT*, *tcpP*, *tcpH*) генов вирулентности у штаммов холерного вибриона классического биовара, типичного и генетически измененного штаммов биовара Эль Тор. Выявлены значительные различия по времени и уровню максимальной экспрессии указанных генов у штаммов классического и Эль Тор биоваров. Установлено, что экспрессия генов *ctxA* и *toxR* у штамма геноварианта достигала своего максимума на 1–3 ч раньше других штаммов. При этом уровень экспрессии гена *ctxA* соответствовал уровню классического штамма. Максимальная экспрессия гена *toxR* у штамма геноварианта была выше, чем у типичного Эль Тор и классического штаммов, а также имела четкую обратную корреляцию с экспрессией гена *ctxA*. Экспрессия генов *tcpA*, *toxT* и *tcpH* у штамма классического биовара достигала максимума на 1–2 ч раньше, чем у штаммов биовара Эль Тор. Указанные различия следует учитывать при проведении научно-исследовательских работ, связанных с изучением экспрессии основных генов вирулентности.

Ключевые слова: холерный вибрион, геноварианты, экспрессия генов вирулентности.

Корреспондирующий автор: Челдышова Надежда Борисовна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Челдышова Н.Б., Девдариани З.Л. Сравнительный анализ экспрессии основных генов вирулентности у различных штаммов *Vibrio cholerae* O1. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 3:151–157. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-151-157

Поступила 23.12.2021. Отправлена на доработку 01.03.2022. Принята к публ. 22.03.2022.

N.B. Cheldyshova, Z.L. Devdariani

Comparative Analysis of Expression of the Main Virulence Genes in Various *Vibrio cholerae* O1 Strains

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

Abstract. The aim of the work was a comparative study of the expression of the main virulence genes in *Vibrio cholerae* strains of the classical biovar, typical and genetically modified strains of *V. cholerae*, El Tor biovar. **Materials and methods.** Natural toxigenic strains of *V. cholerae* O1, classical biovar (J89, Pakistan, 1969), typical (M-887, Astrakhan, 1970) and genetically modified (301, Taganrog, 2011) strains of the El Tor biovar were used as model ones. The strains were grown under optimum conditions for the production of cholera toxin and toxin-coregulated pili. The assessment of strain growth was carried out in LB broth at room temperature with determination of the cells number on a Biowave DNA spectrophotometer (Biochrome Ltd., UK). Determination of gene expression was performed using real-time PCR with reverse transcription. **Results and discussion.** The expression of structural (*ctxA*, *tcpA*) and regulatory (*toxR*, *toxT*, *tcpP*, *tcpH*) virulence genes has been investigated in *V. cholerae* strains of the classical biovar, typical and genetically modified strains of the El Tor biovar. Significant differences have been revealed in terms of time and level of maximum expression of these genes in strains of classical and El Tor biovars. It was found that *ctxA* and *toxR* genes expression in the genovariant strain reached its maximum 1–3 h earlier than in the other strains. At the same time, the level of *ctxA* gene expression corresponded to the level of the classical strain. The maximum expression of the *toxR* gene in the genovariant strain was higher than in typical El Tor and classical strains, and also had a clear inverse correlation with *ctxA* gene expression. Expression of the *tcpA*, *toxT*, and *tcpH* genes in the classical biovar strain reached its maximum 1–2 h earlier than in the El Tor biovar strains. These differences should be taken into account when conducting research work related to the study of the expression of the main virulence genes.

Key words: *Vibrio cholerae*, genovariants, expression of virulence genes.

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

Corresponding author: Nadezhda B. Cheldyshova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Cheldyshova N.B., Devdariani Z.L. Comparative Analysis of Expression of the Main Virulence Genes in Various *Vibrio cholerae* O1 Strains. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 3:151–157. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-151-157

Received 23.12.2021. Revised 01.03.2022. Accepted 22.03.2022.

Cheldyshova N.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5759-3765>

Холерный вибрион, являющийся этиологическим агентом холеры, обладает рядом факторов вирулентности, основными из которых являются холерный токсин (ХТ), вызывающий профузную диарею, и токсин-корегулируемые пили адгезии (ТКПА), необходимые для колонизации вибрионами тонкого кишечника человека. ХТ кодируется генами оперона *ctxAB*, расположенного на профаге СТХф. За синтез ТКПА отвечают гены кластера *tcpA-F*, расположенные на острове патогенности VPI-1 (от *Vibrio pathogenicity island*) [1, 2]. На том же острове располагаются и регуляторные гены (*tcpP*, *tcpH* и *toxT*), которые совместно с регуляторным геном *toxR*, а также генами оперона *ctxAB* и кластера генов *tcpA-F* входят в генную сеть вирулентности холерного вибриона [3, 4]. Регуляция генов вирулентности у холерного вибриона происходит по каскадному типу. Непосредственным активатором транскрипции генов *ctxA* и *tcpA* является белок ToxT, кодируемый одноименным геном. Экспрессия гена *toxT* регулируется двумя трансмембранными белками, продуктами генов *toxR* и *tcpP*. Активация белков ToxR и TcpP происходит под влиянием белков ToxS и TcpH соответственно [5–7]. Гены *toxRS* экспрессируются конституативно, в то время как экспрессия генов оперона *tcpPH* стимулируется продуктами генов *aphA* и *aphB* [8]. На активность белков ToxR и TcpP также оказывают влияние различные факторы внешней среды [8, 9]. Следует отметить, что регуляция генов ХТ и ТКПА у штаммов *Vibrio cholerae* классического и Эль Тор биоваров несколько отличается. В первую очередь это касается белка ToxR, который у классических штаммов может регулировать экспрессию генов оперона *ctxAB* как опосредованно через белок ToxT, так и непосредственно, в то время как у штаммов вибриона Эль Тор для активации данных генов обязательно требуется белок ToxT [9]. Кроме того, между биоварами существуют различия и в активации транскрипции оперона *tcpPH* белком AphB, вызванные различиями в промоторной области оперона у штаммов двух биоваров [10].

Локализация основных генов вирулентности холерного вибриона на мобильных генетических элементах способствует его постоянной изменчивости. Так, первые шесть пандемий холеры (с 1817 по 1923 год) были вызваны штаммами *V. cholerae* классического биовара; возбудителем седьмой пандемии, начавшейся в 1961 г., стал биовар Эль Тор, штаммы которого приобрели основные гены вирулентности. В 90-х гг. прошлого столетия произошло сразу два значительных события. Во-первых, генетическая структура вибрионов Эль Тор претерпела серьезные изменения, способствовавшие появлению новых генетически измененных штаммов (геновариантов) с повышенной вирулентностью. Во-вторых, появился новый возбудитель холеры, *V. cholerae* O139-серогруппы, который вызвал эпидемии холеры в Индии и Бангладеш, а впоследствии распространился на другие азиатские страны. Высказывалось

даже предположение, что появление штаммов O139-серогруппы станет началом восьмой пандемии холеры [11]. Однако эти опасения не оправдались, и на сегодняшний день геноварианты практически полностью вытеснили других возбудителей холеры [2, 12, 13].

Геноварианты *V. cholerae* биовара Эль Тор обладают рядом генетических особенностей, отличающих их от типичных штаммов. Одним из основных отличий генетически измененных штаммов является замена в их геноме профага СТХф^{Eltor} на СТХф^{Class}, несущий ген В-субъединицы ХТ классического типа (*ctxB1* вместо *ctxB3*), СТХф гибридного типа (*ctxB1*, *rstR^{Eltor}*) или СТХф с геном *ctxB7* [12, 14]. Продукция ХТ геновариантами значительно выше, чем у типичных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, и приближается к таковой у классических штаммов [15]. Другой особенностью геновариантов, доминирующих в настоящее время, является наличие однонуклеотидной синонимичной замены (А/Г в положении 266 п.н. от начала гена) в гене *tcpA*, кодирующем синтез основной субъединицы ТКПА. Новый аллель *tcpA* был обозначен как *tcpAET^{CIRS}* [16]. Изменения коснулись и островов пандемичности VSP-I и VSP-II, которые утратили ряд генов [16, 17]. Эти и другие изменения в структуре генома геновариантов привели к повышению их вирулентности и эпидемического потенциала по сравнению с типичными вибрионами Эль Тор. В настоящее время геноварианты являются основным возбудителем холеры, которые с 2011 по 2020 год вызвали свыше 4,4 млн случаев холеры в различных странах мира [14]. Однако если исследования экспрессии генов вирулентности у классических и типичных вибрионов Эль Тор ранее уже проводились [18–21], то экспрессия генов вирулентности у генетически измененных штаммов изучена еще недостаточно. В частности, до сих пор нет точных данных о времени максимальной экспрессии основных генов вирулентности у различных штаммов холерного вибриона. В связи с этим **целью** данного исследования явилось сравнительное изучение экспрессии основных структурных и регуляторных генов вирулентности у штаммов *V. cholerae* классического биовара, типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор.

Материалы и методы

Исследование бактериальных штаммов, условий культивирования проводилось на природных токсигенных штаммах *V. cholerae* O1: одном штамме классического биовара (J89 (СТХф^{Class}), Пакистан, 1969 г., источник выделения неизвестен) и двух штаммах *V. cholerae* биовара Эль Тор: типичном (М-887 (СТХф^{Eltor}), Астрахань, 1970 г., выделен от больного) и генетически измененном (301 (СТХф гибридного типа), Таганрог, 2011 г., выделен из внешней среды). Для выделения РНК штаммы выращивали в оптимальных для продукции ХТ и ТКПА условиях: клас-

сический штамм и геновариант биовара Эль Тор – на бульоне LB (pH 6,8) при температуре 30 °С с аэрацией, типичный Эль Тор – на бульоне АК1, pH 7,6, при температуре 37 °С [19].

Исследование ростовых свойств штаммов осуществляли на бульоне LB при комнатной температуре с определением количества клеток через 2, 3, 4 и 5 ч культивации при помощи сканирующей спектрофотометрии на приборе Biowave DNA (Biochrome Ltd., Великобритания).

Выделение РНК вели набором Promega Total RNA Isolation System (Promega, США) по протоколу производителя. Качественную и количественную оценку выделенной РНК осуществляли при помощи сканирующей спектрофотометрии на приборе Biowave DNA (Biochrome Ltd., Великобритания).

Обратная транскрипция проводилась набором реактивов «Реверта» («АмплиСенс», Россия) по соответствующему протоколу.

ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием амплификатора Rotor-Gene Q

(QIAGEN, Германия), как описано ранее [22]. Ген «домашнего хозяйства» *recA*, экспрессия которого отличается постоянством и не зависит от условий внешней среды, использован как ген-нормализатор. Праймеры и зонды приведены в табл. 1.

Нормализацию и обсчет результатов вели при помощи программного обеспечения Rotor-Gene 1.8.17.5, методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [24]. Для статистической обработки данных использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Как известно, максимальная экспрессия генов наблюдается в логарифмической фазе роста, которая у холерных вибрионов наступает примерно через 2–3 ч от начала культивирования и продолжается около 7–9 ч [25]. В то же время в протоколах к наборам для выделения РНК рекомендуется брать на исследование штаммы, подрощенные на соот-

Таблица 1 / Table 1

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованных для определения относительной экспрессии структурных и регуляторных генов *V. cholerae*

Nucleotide sequences of primers and probes used to determine the relative expression of structural and regulatory *V. cholerae* genes

Праймеры и зонды Primers and probes	Нуклеотидная последовательность 5' – 3' The nucleotide sequence 5' – 3'	Авторы Authors
recAel-F recAel-R recAel-probe	ACGGGTAACCTCAAGCAATC TATCCAAACGAACAGAAGCG (FAM)–CCACTGGCGGTAACGCACTGA–(BHQ1)	[22]
ctxA-F ctxA-R ctxA-probe	TGCCAAGAGGACAGAGTGAG ATCCATCATCGTGCCTAACA (FAM)–TCCCGTCTGAGTTCCTCTTGCAATG–(BHQ1)	
recAcl-RT1 recAcl-RT2 recAcl-probe	5'–CGCTTCTGTTTCGTTTGGATA–3' 5'–TGATACGGGTTTCGTTACCA–3' (FAM)–CGCCTTCTTTGATTGCGCCA–(BHQ1)	Рассчитаны авторами Calculated by the authors
tcpAel-F tcpAel-R tcpAel-probe	CGCTGAGACCACACCCATA GAAGAAGTTTGTAAGAAGAACACG (FAM)–AGAAAACCGGTCAAGAGGGT–(BHQ1)	
tcpAcl-RT1 tcpAcl-RT2 tcpAcl-probe	5'–TTCGACAGATATGACCAAGG–3' 5'–TACTAGCAGCTGTCGATCA–3' (FAM)–TTGCACTGACACAGACATACCGTGG–(BHQ1)	[23]
toxR-F toxR-R toxR-probe	CGGAACCGTTTGTGACGTATT CTCGCAATGATTGCGATGAC (FAM)–TTAACCCAAGCCATTTCGAC–(BHQ1)	
toxT-F toxT-R toxT-probe	TGATGATCTTGATGCTATGG GACTGATATGCAATCTGTT (FAM)–GCGTAATTGGCGTTGGGCAGAT–(BHQ1)	Рассчитаны авторами Calculated by the authors
tcpPel-RT1 tcpPel-RT2 tcpPel-probe	5'–ACCTTTGGTGGAATGAATGC–3' 5'–GGGCAGGATGATATTCACAGA–3' (FAM)–TGCACAAGATCCAATGAAGCCAGA–(BHQ1)	
tcpPcl-RT2 tcpPcl-probe tcpHcl-RT1	5'–CGGCTTCATTGGATCTTGT–3' (FAM)–CCCGATAACCTTTGGTGGAACGA–(BHQ1) 5'–ATCCAATGTTTGGCTTACCC–3'	
tcpHel-RT1 tcpHel-RT2 tcpHel-probe	5'–TGTAACGATCATCGCACTCC–3' 5'–GGTCTGGGTAAGCCAAACAT–3' (FAM)–CATCAATAATCATTTGTGCCGTGCG–(BHQ1)	
tcpHcl-RT1 tcpHcl-RT2 tcpHcl-probe	5'–ATCCAATGTTTGGCTTACCC–3' 5'–CATTGTAATCACGGCTCACAT–3' (FAM)–CATTGCCAGATCCTAGCTCTCAGAAGC–(BHQ1)	

ветствующих средах в течение 2–3 ч, когда штаммы еще не успели достигнуть максимума экспрессии, что часто приводит к ошибкам в определении реального уровня экспрессии генов. В связи с этим перед исследованием экспрессии генов вирулентности у различных токсигенных штаммов *V. cholerae* мы определили их ростовые свойства. Установлено, что у типичного штамма Эль Тор экспоненциальное увеличение численности клеток наблюдалось уже к 2 ч культивации. У штамма геноварианта и штамма классического биовара логарифмическая фаза роста наблюдалась позже, между 4 и 5 ч культивации соответственно.

Таким образом, штаммы классического биовара и геноварианта вступали в логарифмическую фазу роста позже типичных вибрионов Эль Тор.

Учитывая полученные данные, выделение РНК производилось нами через 3, 4, 5 и 6 ч после культивации штаммов в оптимальных для экспрессии указанных генов условиях, описанных ранее. Выделение РНК на более ранних сроках было невозможно, так как штаммы не достигали необходимого по протоколу количества клеток.

На первом этапе работы мы исследовали экспрессию двух структурных генов вирулентности: гена *ctxA*, ответственного за синтез А субъединицы ХТ и обуславливающего его токсическую функцию, а также гена *tcpA*, кодирующего основную субъединицу ТКПА.

Исследование экспрессии гена *ctxA* у штаммов классического, типичного и генетически измененного штаммов биовара Эль Тор показало значительные различия по времени и максимальному уровню. Так, у классического штамма (J-89) экспрессия гена *ctxA* начиналась с 5 относительных единиц (о.е.) и увеличивалась скачкообразно, образуя плато между 4 и 5 ч и достигая максимума (23,17 о.е.) к 6 ч культивации (рис. 1, А, красный график). У штаммов биовара Эль Тор экспрессия гена *ctxA* начиналась с более низкого уровня (1 о.е.). Однако если у типичного штамма (М-887) она увеличивалась в геометрической прогрессии, достигая максимума (8,12 о.е.) к 6 ч культивации (рис. 1, А, синий график), то у штамма геноварианта (301) кривая экспрессии резко поднималась вверх между 4 и 5 ч, практически достигая уровня классического штамма (22,5 о.е.), и снижалась к 6 ч культивации (рис. 1, А, зеленый график).

Экспрессия гена *tcpA* у типичного и генетически измененного штаммов биовара Эль Тор практически не отличалась (рис. 1, В, синий и зеленый графики). Начальные уровни экспрессии составляли около 1 о.е., максимальная экспрессия наблюдалась в 6 ч культивации и составляла (4,5±0,2) о.е. В отличие от них, для классического штамма были характерны более высокие значения экспрессии как в начале культивации (около 3 о.е.), так и на максимуме, который наблюдался на 1 ч раньше, чем у штаммов биовара Эль Тор, и составил 5 о.е. (рис. 1, В, красный график).

Таким образом, экспрессия структурных генов вирулентности холерного вибриона у штаммов классического и Эль Тор биоваров значительно отличалась. В то же время между типичным штаммом биовара Эль Тор и геновариантом различия наблюдались лишь по экспрессии гена *ctxA*. Уровень максимальной экспрессии гена *ctxA* у классического штамма и штамма геноварианта был примерно в 2,8 раза выше, чем у типичного штамма Эль Тор. Вероятно, подобное усиление экспрессии гена *ctxA* у геновариантов по сравнению с типичными штаммами Эль Тор связано с заменой у них профага СТХФ^{Eltor} на СТХФ гибридного типа. Экспрессия гена *tcpA* у типичного и измененного штаммов биовара Эль Тор практически не отличалась. Следует также отметить, что у классического штамма уровень максимальной экспрессии гена *tcpA* хоть и был незначительно выше такового у штаммов Эль Тор, но наблюдался на 1 ч раньше.

Различия в экспрессии структурных генов вирулентности у штаммов классического и Эль Тор вибрионов могут быть связаны и с экспрессией регуляторных генов *toxR*, *toxT*, *tcpP* и *tcpH*, контролирующей по каскадному типу транскрипцию генов вирулентности *ctxA* и *tcpA*. В связи с этим на втором

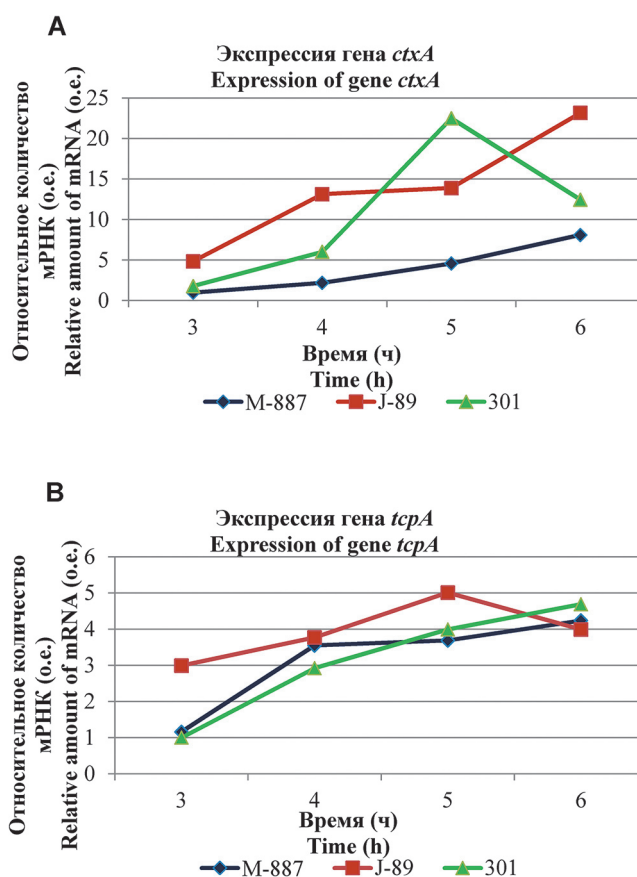


Рис. 1. Экспрессия структурных генов вирулентности *ctxA* (А) и *tcpA* (В) у штаммов *V. cholerae* классического (Ж-89, красный график) и Эль Тор биоваров (типичный штамм – М-887, синий график; геновариант – 301, зеленый график)

Fig. 1. Expression of structural virulence genes *ctxA* (A) and *tcpA* (B) genes in *V. cholerae* strains of classical (J-89, red curve) and El Tor biovars (typical strain – M-887, blue curve; genovariant – 301, green curve)

этапе работы мы исследовали экспрессию указанных регуляторных генов.

Оказалось, что экспрессия гена *toxR* у штамма классического биовара *V. cholerae* была достаточно низкой (1–1,3 о.е.) на всем протяжении исследований (рис. 2, А, красный график), что согласуется с данными других авторов [18], согласно которым указанный ген не имеет существенного значения для экспрессии структурных генов вирулентности. В то же время экспрессия этого гена у типичного штамма Эль Тор, начавшись на том же уровне, что и у классического штамма, резко выросла к 4 ч, достигая максимума (1,95 о.е.), а затем снова снижалась до 1,5 о.е. (рис. 2, А, синий график). Особенно высокой (в 1,3–1,9 раза выше, чем у типичного и классического штаммов, соответственно) оказалась экспрессия гена *toxR* у штамма геноварианта (рис. 2, А, зеленый график). Она обратно коррелировала с экспрессией гена *ctxA*. В 3 ч, когда экспрессия гена *ctxA* была минимальной, уровень экспрессии гена *toxR* у штамма 301 был максимально высоким и составил около 2,5 о.е., однако с 4 до 5 ч, когда транскрипция гена *ctxA* повышалась, экспрессия гена *toxR* снижалась до уровня типичного штамма, показав новый рост к 6 ч культивации, когда уровень транскрипции гена *ctxA* резко снижался. Косвенно это может говорить об авторегуляции гена *toxR*, которая, видимо, наиболее четко прослеживается у штамма геноварианта. Однако данное предположение требует проведения более детального исследования.

Экспрессия гена *toxT* у классического штамма, в отличие от гена *toxR*, была, наоборот, достаточно высокой (5,5 о.е.) уже с 3 ч культивации, достигая максимума (12,7 о.е.) к 5 ч (рис. 2, В, красный график). У типичного штамма М-887 и штамма геноварианта 301 уровень максимальной экспрессии гена *toxT* был в 1,5–2,4 раза ниже соответственно, чем у классических штаммов, и достигал своего максимума только к 6 ч культивации (см. рис. 2, В, синий и зеленый графики).

Экспрессия генов *tcpP* и *tcpH* у геноварианта и типичного штамма Эль Тор практически не различалась и была в 2–2,5 раза ниже, чем у штамма классического биовара (рис. 2, С, D). Максимальная экспрессия гена *tcpP* у всех трех штаммов отмечалась уже к 3 ч культивации (рис. 2, С). Уровень максимальной экспрессии гена *tcpH* наблюдался позже: к 4 ч у классического штамма и к 6 ч у штаммов биовара Эль Тор (рис. 2, D).

Таким образом, уровень экспрессии генов *toxT*, *tcpP* и *tcpH* у штаммов биовара Эль Тор был значительно ниже, чем у классического штамма, что согласуется с сообщениями других исследователей [18–20]. Это свидетельствует о ведущей роли указанных генов в регуляции экспрессии генов *ctxA* и *tcpA*, а следовательно, и в продукции ХТ и ТКПА у штамма классического биовара.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что максимальная экспрессия большинства генов вирулентности у штаммов классического и Эль Тор

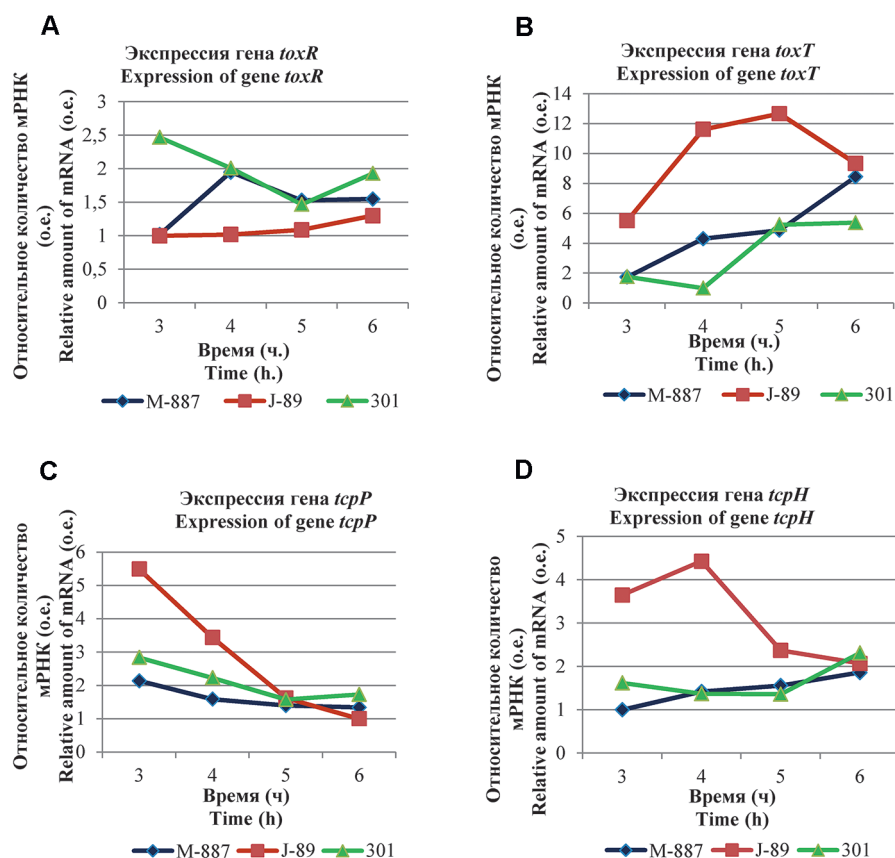


Рис. 2. Экспрессия регуляторных генов *toxR* (А), *toxT* (В), *tcpP* (С) и *tcpH* (D) у штаммов *V. cholerae* классического (J-89) и Эль Тор биоваров (типичный штамм – М-887, геновариант – 301)

Fig. 2. Expression of regulatory genes *toxR* (A), *toxT* (B), *tcpP* (C) and *tcpH* (D) in *V. cholerae* strains of classical (J-89) and El Tor biovars (typical strain – M-887, genovariant – 301)

Таблица 2 / Table 2

Время максимальной экспрессии генов вирулентности у штаммов *V. cholerae*The time of maximum expression of virulence genes in strains of *V. cholerae*

Штамм <i>V. cholerae</i> <i>V. cholerae</i> strain	Биовар Biovar	<i>ctxA</i>	<i>tcpA</i>	<i>toxR</i>	<i>toxT</i>	<i>tcpP</i>	<i>tcpH</i>
J-89	Классический Classical	6*	5	6	5	3	4
M-887	Эль Тор типичный El Tor typical	6	6	4	6	3	6
301	Эль Тор геновариант El Tor genovariant	5	6	3	6	3	6

Примечание: * – время, ч

Note: * – time, h

биоваров наблюдалась в разное время (табл. 2). Так, экспрессия генов *ctxA* и *toxR* у штамма геноварианта достигала своего максимума на 1–3 ч раньше других штаммов. Наибольшая экспрессия генов *tcpA*, *toxT* и *tcpH* у штамма классического биовара наблюдалась на 1–2 ч раньше, чем у штаммов биовара Эль Тор. При этом время достижения наибольшего уровня экспрессии этих генов у вибрионов Эль Тор совпадало. Лишь у гена *tcpP* максимальный уровень экспрессии фиксировался в 3 ч культивации у всех трех штаммов.

Следует отметить, что уровень экспрессии гена *ctxA*, ответственного за синтез холерного токсина, у штамма геноварианта был значительно выше, чем у типичного штамма Эль Тор, приближаясь по данной характеристике к штамму классического биовара, что в совокупности с более ранним достижением максимальной экспрессии этого гена свидетельствует о повышенной вирулентности штамма геноварианта. Указанные особенности, несомненно, связаны с приобретением геновариантами профага СТХф гибридного типа, однако большое влияние на данный процесс, вероятно, оказало и повышение экспрессии регуляторного гена *toxR*, максимальная экспрессия которого наблюдалась уже к 3 ч культивации и была несколько выше остальных штаммов. О влиянии гена *toxR* на повышение экспрессии гена *ctxA* указывает и наличие статистически значимой обратной корреляции в экспрессии указанных генов ($p < 0,01$). В то же время экспрессия генов *tcpA*, *tcpP* и *tcpH* у штамма геноварианта была на уровне типичных штаммов, а гена *toxT* – даже ниже этого уровня. Все это указывает на то, что ведущая роль в регуляции структурных генов вирулентности *ctxA* и *tcpA* у штамма геноварианта принадлежит гену *toxR*.

В целом полученные результаты говорят о значительных отличиях в уровне и времени максимальной экспрессии генов вирулентности у различных эпидемически опасных штаммов *V. cholerae* O1, что следует учитывать при проведении научно-исследовательских работ, связанных с изучением экспрессии основных генов вирулентности.

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

Список литературы

- Karalis D.K., Somara S., Maneval D.R. Jr., Johnson J.A., Kaper J.B. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature*. 1999; 399(6734):375–9. DOI: 10.1038/20715.
- Смирнова Н.И., Заднова С.П., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Челдышова Н.Б., Черкасов А.В. Сравнительный молекулярно-генетический анализ мобильных элементов природных штаммов возбудителей холеры. *Генетика*. 2013; 49(9):1036–47. DOI: 10.7868/S0016675813090087.
- Matson J.S., Withey J.H., DiRita V.J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 2007; 75(12):5542–9. DOI: 10.1128/IAI.01094-07.
- Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кулышань Т.А., Щелканова Е.Ю., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Влияние делеции профага СТХф возбудителя холеры на экспрессию регуляторных генов, контролирующих вирулентность и образование биопленки. *Генетика*. 2017; 53(3):284–97. DOI: 10.7868/S0016675817020114.
- DiRita V.J., Parsot C., Jander G., Mekalanos J.J. Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1991; 88(12):5403–7. DOI: 10.1073/pnas.88.12.5403.
- Hase C.C., Mekalanos J.J. TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998; 95(2):730–4. DOI: 10.1073/pnas.95.2.730.
- Krukoni E.S., Yu R.R., Dirita V.J. The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/TcpX virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol. Microbiol.* 2000; 38(1):67–84. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02111.x.
- Li N., Zheng Y., Shi M., Xue Y., Zhang T., Ji S., Yang M. TcpP L152A constitutively activating virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Curr. Microbiol.* 2019; 76(5):583–9. DOI: 10.1007/s00284-019-01659-y.
- Hung D.T., Mekalanos J.J. Bile acids induce cholera toxin expression in *Vibrio cholerae* in a ToxT-independent manner. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005; 102(8):3028–33. DOI: 10.1073/pnas.0409559102.
- Kovacikova G., Skorupski K. Differential activation of the *tcpH* promoter by AphB determines biotype specificity of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2000; 182(11):3228–38. DOI: 10.1128/JB.182.11.3228-3238.2000.
- Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. DOI: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
- Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9):3296–9. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002.
- Safa A., Sultana J., Dac Cam P., Mwansa J.C., Kong R.Y. *Vibrio cholerae* O1 hybrid El Tor strains, Asia and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(6):987–8. DOI: 10.3201/eid1406.080129.
- Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Монахова Е.В., Левченко Д.А., Янович Е.Г., Водополян А.С., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И., Подойницына О.А. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 1:43–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51.
- 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 and classical biotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11):4283–6. DOI: 10.1128/JCM.00799-10.

16. Grim C.J., Choi J., Chun J., Jeon Y.-S., Taviani E., Hasan N.A., Haley B., Huq A., Colwell R.R. Occurrence of the *Vibrio cholerae* seventh pandemic VSP-I island and a new variant. *OMICS*. 2010; 14(1):1–7. DOI: 10.1089/omi.2009.0087.
17. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.-M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque S.M., Faruque A.S.G., 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.
18. Beyhan S., Tischler A.D., Camilli A., Yildiz F.H. Differences in gene expression between the classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* O1. *Infect. Immun.* 2006; 74(6):3633–42. DOI: 10.1128/IAI.01750-05.
19. DiRita V.J., Neely M., Taylor R.K., Bruss P.M. Differential expression of the *ToxR* regulon in classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* is due to biotype – specific over *toxT* expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996; 93(15):7991–5. DOI: 10.1128/IAI.01750-05.
20. Lee S.H., Hava D.L., Waldor M.K., Camilli A. Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell*. 1999; 99(6):625–34. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81551-2.
21. Murley Y.M., Behari J., Griffin R., Calderwood S.B. Classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* differ in timing of transcription of *tcpPH* during growth in inducing conditions. *Infect. Immun.* 2000; 68(5):3010–4. DOI: 10.1128/IAI.68.5.3010-3014.2000.
22. Крицкий А.А., Челдышова Н.Б., Тучков И.В., Смирнова Н.И. Разработка алгоритма определения уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* *Vibrio cholerae* методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 3:53–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-53-57.
23. Fykse E.M., Skogan G., Davies W., Olsen J.S., Blatny J.M. Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(5):1457–66. DOI: 10.1128/AEM.01635-06.
24. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 2001; 25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
25. Адамов А.К., Наумшина М.С. Холерные вибрионы. Саратов: Изд-во Саратовского университета; 1984. 328 с.
1. Karaolis D.K., Somara S., Maneval D.R. Jr., Johnson J.A., Kaper J.B. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature*. 1999; 399(6734):375–9. DOI: 10.1038/20715.
2. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Agafonov D.A., Shashkova A.V., Cheldyshova N.B., Cherkasov A.V. [Comparative molecular-genetic analysis of mobile elements of natural strains of cholera pathogens]. *Genetika [Genetics]*. 2013; 49(9):1036–47. DOI: 10.7868/S0016675813090087.
3. Matson J.S., Withey J.H., DiRita V.J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 2007; 75(12):5542–9. DOI: 10.1128/IAI.01094-07.
4. Smirnova N.I., Agafonov D.A., Kul'shan' T.A., Shchelkanova E.Yu., Krasnov Ya.M., Lozovsky Yu.V., Kutayev V.V. [Effect of deletion of the CTXφ prophage of the cholera causative agent on the expression of regulatory genes that control virulence and biofilm formation]. *Genetika [Genetics]*. 2017; 53(3):284–97. DOI: 10.7868/S0016675817020114.
5. DiRita V.J., Parsot C., Jander G., Mekalanos J.J. Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1991; 88(12):5403–7. DOI: 10.1073/pnas.88.12.5403.
6. Hase C.C., Mekalanos J.J. *TcpP* protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998; 95(2):730–4. DOI: 10.1073/pnas.95.2.730.
7. Krukoni E.S., Yu R.R., Dirita V.J. The *Vibrio cholerae* *ToxR*/*TcpP*/*ToxT* virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol. Microbiol.* 2000; 38(1):67–84. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02111.x.
8. Li N., Zheng Y., Shi M., Xue Y., Zhang T., Ji S., Yang M. *TcpP* L152A constitutively activating virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Curr. Microbiol.* 2019; 76(5):583–9. DOI: 10.1007/s00284-019-01659-y.
9. Hung D.T., Mekalanos J.J. Bile acids induce cholera toxin expression in *Vibrio cholerae* in a *ToxT*-independent manner. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005; 102(8):3028–33. DOI: 10.1073/pnas.0409559102.
10. Kovackova G., Skorupski K. Differential activation of the *tcpPH* promoter by *AphB* determines biotype specificity of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2000; 182(11):3228–38. DOI: 10.1128/JB.182.11.3228-3238.2000.
11. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. DOI: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
12. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9):3296–9. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002.
13. Safa A., Sultana J., Dac Cam P., Mwansa J.C., Kong R.Y. *Vibrio cholerae* O1 hybrid El Tor strains, Asia and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(6):987–8. DOI: 10.3201/eid1406.080129.
14. Noskov A.K., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., Monakhova E.V., Levchenko D.A., Yanovich E.G., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Nepomnyashchaya N.B., Ezhova M.I., Podoinitsyna O.A. [Characteristics of the epidemiological situation on cholera in the world and in the Russian Federation in 2020 and forecast for 2021]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (1):43–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51.
15. 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 and classical biotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11):4283–6. DOI: 10.1128/JCM.00799-10.
16. Grim C.J., Choi J., Chun J., Jeon Y.-S., Taviani E., Hasan N.A., Haley B., Huq A., Colwell R.R. Occurrence of the *Vibrio cholerae* seventh pandemic VSP-I island and a new variant. *OMICS*. 2010; 14(1):1–7. DOI: 10.1089/omi.2009.0087.
17. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.-M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque S.M., Faruque A.S.G., 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.
18. Beyhan S., Tischler A.D., Camilli A., Yildiz F.H. Differences in gene expression between the classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* O1. *Infect. Immun.* 2006; 74(6):3633–42. DOI: 10.1128/IAI.01750-05.
19. DiRita V.J., Neely M., Taylor R.K., Bruss P.M. Differential expression of the *ToxR* regulon in classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* is due to biotype – specific over *toxT* expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996; 93(15):7991–5. DOI: 10.1128/IAI.01750-05.
20. Lee S.H., Hava D.L., Waldor M.K., Camilli A. Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell*. 1999; 99(6):625–34. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81551-2.
21. Murley Y.M., Behari J., Griffin R., Calderwood S.B. Classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* differ in timing of transcription of *tcpPH* during growth in inducing conditions. *Infect. Immun.* 2000; 68(5):3010–4. DOI: 10.1128/IAI.68.5.3010-3014.2000.
22. Kritsky A.A., Cheldyshova N.B., Tuckov I.V., Smirnova N.I. [Development of the algorithm for identification of the level of *Vibrio cholerae* *ctxA* and *toxR* gene expression using RT-PCR with real-time hybridization-fluorescent registration of results]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:53–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-53-57.
23. Fykse E.M., Skogan G., Davies W., Olsen J.S., Blatny J.M. Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(5):1457–66. DOI: 10.1128/AEM.01635-06.
24. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 2001; 25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
25. Адамов А.К., Наумшина М.С. [Cholera Vibrios]. Saratov: Publishing House of the Saratov University; 1984. 328 p.

Authors:

Cheldyshova N.B., Devdariani Z.L. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

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

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-158-163

УДК 616.98:579.841.11

П.Р. Чирсков¹, Т.Л.А. Вуй², Д.В. Устинов¹, А.Д. Виктор¹, И.Б. Захарова¹

Сравнительный анализ потенциальных детерминант резистентности к аминогликозидам у штаммов *Burkholderia pseudomallei* с различным уровнем чувствительности к гентамицину

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

Цель – поиск и сравнительный анализ потенциальных детерминант резистентности к аминогликозидам у чувствительных к гентамицину штаммов *Burkholderia pseudomallei*. **Материалы и методы.** Проведен биоинформатический анализ шотган полногеномных сиквенсов трех чувствительных к гентамицину штаммов возбудителя мелиоидоза. **Результаты и обсуждение.** Возбудитель мелиоидоза естественно резистентен к аминогликозидам, и этот признак является диагностическим, однако встречаются штаммы, полностью или частично утратившие его. Такие штаммы при классической схеме выделения и идентификации, как правило, не учитываются. При этом значимых отличий в клинических проявлениях мелиоидоза при инфицировании резистентными и чувствительными к гентамицину штаммами не обнаружено. У исследованных штаммов, принадлежащих к трем разным сиквенс-типам (ST70, ST948 и ST1566), обнаружены точечные миссенс-мутации в генах трех эффлюкс-насосов семейства RND: AmrAB-OprA, BpeAB-OprB и BpeEF-OprC – и одного с неизвестными функциями, а также в гене аминогликозид-6'-N-ацетилтрансферазы AAC(6')-III. У всех трех штаммов обнаружены аминокислотные замены в периплазматическом адаптере AmrA: ARG160SER, Arg116Gln и Gly237Arg, Thr317Lys. У умеренно чувствительных штаммов (ST948 и ST1566) обнаружена идентичная замена Val222Met в репрессоре оперона AmrAB-OprA – AmrR. Возможно, что у исследованных штаммов промежуточный уровень чувствительности к гентамицину опосредован конститутивной экспрессией оперона AmrAB-OprA, что частично компенсирует выявленные структурные дефекты. Также не исключена вероятность участия в утрате резистентности к гентамицину динуклеотидной делеции в гене аминогликозид-6'-N-ацетилтрансферазы AAC(6')-III, а также обнаруженных мутаций у гомологов периплазматического адаптера (BPSL2234) неохарактеризованного эффлюкс-оперона семейства RND.

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, чувствительность к гентамицину, эффлюкс-насосы семейства RND.

Корреспондирующий автор: Захарова Ирина Борисовна, e-mail: zib279@gmail.com.

Для цитирования: Чирсков П.Р., Вуй Т.Л.А., Устинов Д.В., Виктор А.Д., Захарова И.Б. Сравнительный анализ потенциальных детерминант резистентности к аминогликозидам у штаммов *Burkholderia pseudomallei* с различным уровнем чувствительности к гентамицину. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 3:158–163. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-158-163

Поступила 15.04.2022. Отправлена на доработку 17.05.2022. Принята к публ. 26.05.2022.

P.R. Chirskov¹, T.L.A. Bui², D.V. Ustinov¹, A.D. Viktorov¹, I.B. Zakharova¹

Comparative Analysis of Potential Determinants of Resistance to Aminoglycosides in *Burkholderia pseudomallei* Strains with Different Level of Sensitivity to Gentamicin

¹Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;²Joint Vietnam-Russia Tropical Science and Technology Research Center, Hanoi, Vietnam

Abstract. The aim of the study was to identify and compare potential determinants of aminoglycoside resistance in gentamicin susceptible *Burkholderia pseudomallei* strains. **Materials and methods.** A bioinformatics analysis of whole genome shotgun sequences of three *B. pseudomallei* strains having different levels of sensitivity to gentamicin was carried out. **Results and discussion.** *B. pseudomallei* is intrinsically resistant to aminoglycosides. Such strains, as a rule, are not taken into account in the classical scheme of isolation and identification. At the same time, there were no significant differences in the clinical manifestations of melioidosis during infection with gentamicin-resistant and sensitive strains. In *B. pseudomallei* strains of different sequence types (ST70, ST948, and ST1566), point missense mutations were found in the genes of three efflux pumps of the RND family: AmrAB-OprA, BpeAB-OprB, BpeEF-OprC, and one with unknown functions, as well as in the gene aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase AAC(6')-III. All three strains had amino acid substitutions in the AmrA periplasmic linker: ARG160SER, Arg116Gln and Gly237Arg, Thr317Lys, respectively. In moderately sensitive strains (ST948 and ST1566), an identical Val222Met substitution was found in the repressor of the AmrAB-OprA operon, AmrR. It is likely that the intermediate level of sensitivity to gentamicin in the studied strains is mediated by the constitutive expression of the AmrAB-OprA operon, which partially compensates for the structural defects. It is also possible that a dinucleotide deletion in the AAC(6')-III aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase gene, as well as detected mutations in the homologues of the periplasmic linker (BPSL2234) of an uncharacterized efflux operon of the RND family, are involved in the loss of resistance to gentamicin.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, susceptibility to gentamicin, RND efflux pumps.

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

Corresponding author: Irina B. Zakharova, e-mail: zib279@gmail.com.

Citation: Chirskov P.R., Bui T.L.A., Ustinov D.V., Viktorov A.D., Zakharova I.B. Comparative Analysis of Potential Determinants of Resistance to Aminoglycosides in *Burkholderia pseudomallei* Strains with Different Level of Sensitivity to Gentamicin. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:158–163. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-158-163
Received 15.04.2022. Revised 17.05.2022. Accepted 26.05.2022.

Chirskov P.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2847-5177>
Bui T.L.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9266-2156>
Ustinov D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4516-731X>

Viktorov A.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5193-6402>
Zakharova I.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7808-7658>

Burkholderia pseudomallei является возбудителем мелиоидоза и представляет собой грамотрицательную палочковидную подвижную бактерию, которая распространена в почве тропических и субтропических регионов всех континентов. Подавляющее большинство штаммов *B. pseudomallei* обладает высоким уровнем устойчивости к аминогликозидам, что используется для выделения возбудителя из почвы и клинического материала с использованием агара Эшдауна, основным селективным ингредиентом которого является гентамицин. Чувствительные к гентамицину (Gm^S) изоляты при таком способе выделения культуры практически не учитываются и встречаются в соотношении к резистентным (Gm^R) приблизительно 1 на 1000 [1]. Однако фактическое число штаммов, чувствительных к аминогликозидам, может быть значительно выше. Так, при использовании альтернативных методов выделения было обнаружено, что в отдельных случаях Gm^S -штаммы являются в популяции доминирующими [2]. Недавно показано, что клинические проявления случаев мелиоидоза, обусловленные Gm^S -штаммами *B. pseudomallei*, не имеют значимых отличий от инфекций, вызванных Gm^R -штаммами. Кроме того, опубликованы данные, свидетельствующие о более высокой инфекционности и вирулентности Gm^S -штаммов. В частности, среди взрослых, инфицированных Gm^S -штаммами, доля пациентов без выявленных факторов риска была статистически достоверно выше, чем среди зараженных резистентными, а доля пациентов с диабетом – ниже [3]. При педиатрическом мелиоидозе, вызванном преимущественно Gm^S -штаммами *B. pseudomallei*, бактериemia с септическим шоком присутствовала у 57 % пациентов, из которых 43 % окончились летально, несмотря на отсутствие каких-либо очевидных predisposing факторов [4].

Ключевую роль в естественной или приобретенной лекарственной устойчивости многих грамотрицательных патогенов играют системы эффлюкса семейства RND (resistance, nodulation, cell division), среди которых участие в обеспечении устойчивости к аминогликозидам и макролидам у *B. pseudomallei* доказано только для эффлюкс-насоса AmrAB-OprA [5, 6]. У обнаруженных ранее гентамицин-чувствительных штаммов *B. pseudomallei* идентифицированы точечные миссенс-мутации и динуклеотидные (GC) делеции в гене транспортера AmrB [2, 7], а также отсутствие экспрессии оперона AmrAB-OprA из-за его делеции или регуляторных мутаций [1]. Участие других систем эффлюкса семейства RND в обеспечении резистентности к гентамицину остается неясным, так же как неясен вклад аминогликозидтрансфераз. В связи с этим **цель** настоящей

работы – проведение поиска и сравнительного анализа потенциальных детерминант резистентности к аминогликозидам у высоко и умеренно чувствительных к гентамицину штаммов *B. pseudomallei*, выделенных в центральном Вьетнаме.

Материалы и методы

Проведен биоинформатический анализ шотган полногеномных сиквенсов штаммов возбудителя мелиоидоза, полностью (*B. pseudomallei* V1512) или частично (*B. pseudomallei* V1607 и V1608) утративших резистентность к гентамицину: диаметры зон подавления роста на агаре Мюллера – Хинтона – 30, 13 и 14 мм соответственно, при полном отсутствии подавления роста у резистентных штаммов. Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Литва) в соответствии с инструкцией производителя. Секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq (Illumina Inc., США), используя рекомендованные производителем наборы реагентов. Геномы собирали *de novo* на ассемблерах Newbler v. 3.0 [8] и SPAdes v. 3.13.0 [9]. Аннотацию осуществляли при помощи сервиса NCBI PGAP v. 5.3 [10]. Аллели локусов по схеме MLST определяли при помощи инструментария базы данных *Burkholderia pseudomallei* MLST Data bases (<https://pubmlst.org/bpseudomallei>). Данные анализировали с помощью программного пакета Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>), в качестве референтных использовали последовательности хромосом 1 и 2 *B. pseudomallei* K96243 (GenBank NC006350 и NC006351). Моделирование белковых структур проводили с использованием алгоритмов SWISS-MODEL (Swiss Institute of Bioinformatics) [11].

Шотган-полногеномные сиквенсы штаммов *B. pseudomallei* V1512 и *B. pseudomallei* V1607 доступны в GenBank NCBI под номерами NZ_PHRB000000000.1 и NZ_WTLF000000000.1.

Результаты и обсуждение

В геномных последовательностях штаммов *B. pseudomallei* V1512 (ST70), V1607 (ST948) и V1608 (ST1566), полностью или частично утративших резистентность к гентамицину, проведен поиск и анализ детерминант, доказанно или потенциально обеспечивающих этот признак. В сравнении с референтными последовательностями большой и малой хромосом штамма *B. pseudomallei* K96243 (NCBI: NC 006350.1 и NC 006351.1) у исследованных штаммов обнаружены точечные миссенс-мутации в генах трех частично охарактеризованных эффлюкс-насосов се-

мейства RND: AmrAB-OprA, BpeAB-OprB и BpeEF-OprC – и одним с неизвестными функциями, а также в гене аминогликозид-6'-N-ацетилтрансферазы (AAC (6')-III).

Инактивация основного для *B. pseudomallei* RND эффлюкса AmrAB-OprA, который является гомологом MexXY-OprM *Pseudomonas aeruginosa* [12], у возбудителя мелиоидоза приводит к значительному снижению МПК для широкого спектра антибиотиков, включая аминогликозиды. Сходным образом инактивация BpeAB-OprB, гомолога *P. aeruginosa* MexAB-OprM, увеличивает чувствительность ко многим антибиотикам, хотя спектр заметно уже, чем для AmrAB-OprA [13]. Интактный BpeEF-OprC обладает узкой субстратной специфичностью и опосредует устойчивость *B. pseudomallei* к триметоприму, широко распространенную среди клинических и почвенных изолятов. У мутантов со сверхэкспрессией этого насоса его субстратный спектр подобен его гомологу MexEF-OprN у *P. aeruginosa* и включа-

ет хлорамфеникол, фторхинолоны, тетрациклины, сульфаметоксазол и триметоприм [14].

В описанных ранее случаях чувствительность штаммов к гентамицину авторы связывали с мутациями в гене транспортера AmrB эффлюкса AmrAB-OprA [2, 7], тогда как у всех исследованных в настоящей работе штаммов отсутствовали изменения в данном гене. У всех трех штаммов присутствовали аминокислотные замены в периплазматическом адаптере AmrA – Arg160Ser у чувствительного штамма V1512; Arg116Gln и Gly237Arg, Thr317Lys – у умеренно чувствительных штаммов V1607 и V1608 (табл. 1). Аминокислотные замены в периплазматическом адаптере AmrA штаммов V1512 и V1607 локализованы на антипараллельных спиралях домена α -шпильки. Для MexA эффлюкса MexAB-OprM *P. aeruginosa* показано, что инактивирующие помпу мутации сгруппированы между остатками P68 и V129, что соответствует домену α -шпильки в N-концевой части этого белка [15],

Таблица 1 / Table 1

Аминокислотные замены белков частично охарактеризованных эффлюкс-насосов семейства RND у штаммов *B. pseudomallei*, утративших резистентность к гентамицину

Amino acid substitutions in proteins of partially characterized RND efflux pumps in *B. pseudomallei* strains bereft of resistance to gentamicin

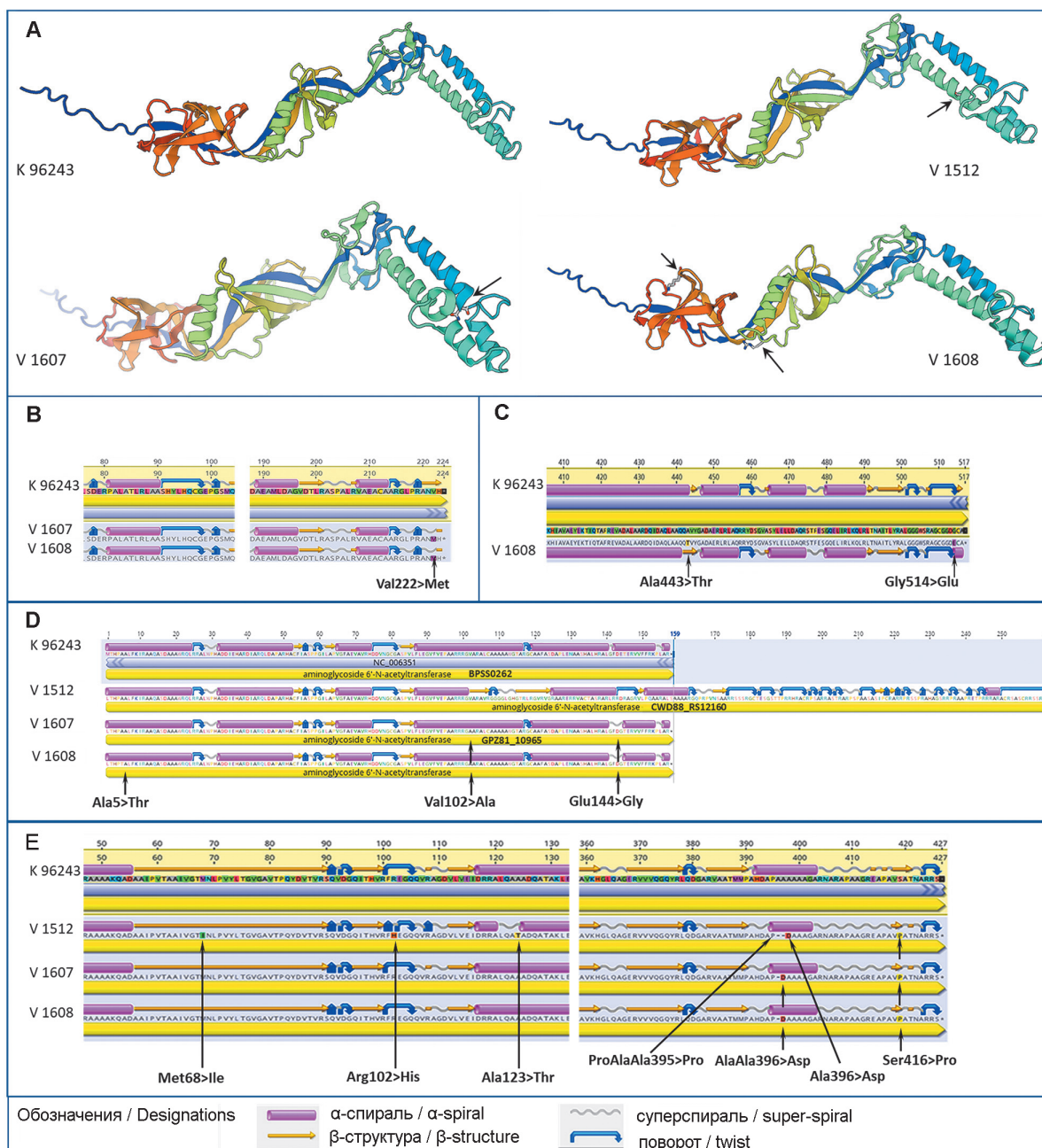
Белок Protein	Локус <i>B. pseudomallei</i> K96243 Locus <i>B. pseudomallei</i> K96243 (GenBank NCBI NC_006350, NC_006351)	Аминокислотные замены (референс>проба) Amino acid substitutions (reference>sample)	Штаммы <i>B. pseudomallei</i> Strains of <i>B. pseudomallei</i>	Чувствительность к гентамицину Susceptibility to gentamicin
AmrAB-OprA				
Белок канала внешней мембраны OprA Outer membrane channel protein OprA	BPSL1802	Ala443>Thr Gly514>Glu	V1608	I
Транспортер AmrB Transporter AmrB	BPSL1803	нет/absent		
Периплазматический адаптер AmrA Membrane fusion protein AmrA	BPSL1804	Arg160>SER	V1512	S
		Arg116>Gln	V1607	I
		Gly237>Arg Thr317>Lys	V1608	I
Регуляторный белок AmrR семейства TetR TetR family regulatory protein AmrR	BPSL1805	Val222>Met	V1607 V1608	I I
BpeAB-OprB				
Регуляторный белок BpeR семейства TetR TetR family regulatory protein BpeR	BPSL0812	нет/absent		
Периплазматический адаптер BpeA Membrane fusion protein BpeA	BPSL0814	Pro46>Ser	V1607	I
Транспортер BpeB Transporter BpeB	BPSL0815	Asn956>Lys	V1512	S
Белок канала внешней мембраны OprB Outer membrane channel protein OprB	BPSL0816	Cys72>Arg	V1512 V1607	S I
		Ala50>Ser	V1512	S
BpeEF-OprC				
Транскрипционный регулятор семейства LysR BpeT Putative LysR-family transcriptional regulator BpeT	BPSS0290	нет/absent		
Транспортер BpeE Transporter BpeE	BPSS0292	нет/absent		
Периплазматический адаптер BpeF Membrane fusion protein BpeF	BPSS0293	нет/absent		
Белок канала внешней мембраны OprC Outer membrane channel protein OprC	BPSS0294	Val294>Ala	V1512	S
			V1607	I
			V1608	I

Примечание: S – чувствительный, I – умеренно устойчивый.

Note: S – sensitive, I – intermediate level of resistance.

причем одна из замен, нарушающих олигомеризацию MexA (V129M), в сравнении с AmrA локализована в пределах двух соседних аминокислотных остатков. У штамма V1608 мутации затронули проксимальный мембранный домен (Thr317Lys) и β -бочонок (Gly237Arg) (рисунок, А). Необходимо отметить, что у обоих умеренно чувствительных штаммов V1607 и V1608 в репрессоре оперона

AmrR семейства TetR присутствовали идентичные замены Val222Met, вследствие чего нарушается фрагмент β -структуры С-концевого участка белка, входящего в состав лиганд-связывающего домена (рисунок, В). Кроме того, у штамма V1608 обнаружены замены Ala443Thr и Gly514Glu в белке канала внешней мембраны OprA, что привело к изменению его вторичной структуры (рисунок, С).



Спектр мутаций и вторичная структура белков исследованных штаммов в сравнении с гомологами референтного штамма *B. pseudomallei* K96243:

A – 3D-модели периплазматического адаптера AmrA эффлюкса AmrAB-OprA; схемы вторичной структуры B – репрессора AmrR эффлюкса AmrAB-OprA; C – белка канала внешней мембраны OprA эффлюкса AmrAB-OprA; D – аминогликозид-6'-N-ацетилтрансферазы; E – гипотетического транспортера семейства AcrB/AcrD/AcrF неохарактеризованного эффлюкса семейства RND. Аминокислотные замены указаны стрелками, неизмененные части не показаны

The spectrum of mutations and the secondary structure of the investigated strains' proteins in comparison with homologues of the reference strain *B. pseudomallei* K96243:

A – 3D-models of the membrane fusion protein AmrA of the AmrAB-OprA efflux; schemes of the secondary structure: B – TetR family regulatory protein AmrR of the AmrAB-OprA efflux; C – outer membrane channel protein OprA of the AmrAB-OprA efflux; D – putative aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase; E – putative AcrB/AcrD/AcrF family membrane protein of the putative RND multi-drug efflux pump. Amino acid substitutions are indicated by arrows, unchanged parts are not shown

Эффлюкс ВреАВ-ОprB имеет доказанную субстратную специфичность для хлорамфеникола, фторхинолонов, тетрациклинов и макролидов. Роль этого эффлюкса в устойчивости к аминогликозидам остается неопределенной. Так, по одним данным, делеция *bpeAB* у сингапурского штамма *B. pseudomallei* KHW приводила к повышению чувствительности к гентамицину [13], тогда как по другим – эффлюкс ВреАВ-ОprB не опосредует отток аминогликозидов. При этом сравнительный анализ показал значительные отличия в аминокислотных последовательностях ВреА и ОprB сингапурского штамма от гомологов других штаммов, что не исключало возможности изменения субстратной специфичности эффлюкса ВреАВ-ОprB у *B. pseudomallei* KHW [16]. У одного из исследованных штаммов с промежуточной чувствительностью к гентамицину – *B. pseudomallei* V1608 – каких-либо изменений в последовательностях белков эффлюкса ВреАВ-ОprB не обнаружено, у другого – *B. pseudomallei* V1607 – присутствовали аминокис-

лотные замены в ВреА (Pro46Ser) и ОprB (Cys72Arg). У полностью утратившего резистентность к гентамицину штамма *B. pseudomallei* V1512 в ОprB в положении 72 обнаружена идентичная замена цистеина на аргинин и дополнительная – Ala50Ser, а также замена Asn956Lys в транспортёре ВреВ (табл. 1).

Среди компонентов эффлюкса ВреEF-ОprC обнаружена единственная аминокислотная замена в белке канала внешней мембраны ОprC (Val294Ala), идентичная для всех трех исследованных штаммов (табл. 1).

Сопоставление спектра мутаций с фенотипами штаммов позволяет предположить, что утрата резистентности к гентамицину не связана с изменениями первичной структуры продуктов эффлюкс-оперонов ВреАВ-ОprB и ВреEF-ОprC. Кроме того, известно, что эти два насоса экспрессируются у *B. pseudomallei* только в мутантах по регуляторным белкам ВреR и ВреТ [7], тогда как у исследованных штаммов мутации в генах этих белков отсутствовали.

Таблица 2 / Table 2

Аминокислотные замены белков неохарактеризованного эффлюкс-насоса семейства RND и аминогликозид-6'-N-ацетилтрансферазы у штаммов *B. pseudomallei*, утративших резистентность к гентамицину

Amino acid substitutions in proteins of putative RND multi-drug efflux pump and aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase in *B. pseudomallei* strains that lost resistance to gentamicin

Белок Protein	Локус <i>B. pseudomallei</i> K96243 Locus <i>B. pseudomallei</i> K96243 (GenBank NCBI NC_006350, NC_006351)	Аминокислотные замены (референс>проба) Amino acid substitutions (reference>sample)	Штаммы <i>B. pseudomallei</i> Strains <i>B. pseudomallei</i>	Чувствительность к гентамицину Susceptibility to gentamicin
Неохарактеризованный эффлюкс-насос семейства RND Putative RND multi-drug efflux pump				
Предполагаемый периплазматический адаптер Putative membrane fusion protein	BPSL2234	Met68>Ile	V1512	S
		Arg102>His	V1512	S
		Ala123>Thr	V1512	S
		ProAlaAla395>Pro	V1512	S
		Ala396>Asp	V1512 V1607 V1608	S I I
		Ser416>Pro	V1512	S
		Ser419>Pro	V1607 V1608	I I
Гипотетический транспортер семейства AcrB/AcrD/AcrF Putative AcrB/AcrD/AcrF family membrane protein	BPSL2235	Arg208>His	V1512	S
		Leu303>Arg	V1607 V1608	I I
Гипотетический мембранный белок Putative membrane protein	BPSL2236	Thr93>Met	V1607	I
Аминогликозид-6'-N-ацетилтрансфераза Putative aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase				
Аминогликозид-6'-N-ацетилтрансфераза Putative aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase	BPSS0262	Сдвиг рамки считывания за счет ΔGC: замена Leu106Val и смещение стоп-кодона в область соседней открытой рамки считывания Shift of the reading frame due to ΔGC: substitution of Leu106Val and drifting of the stop-codon towards the neighboring open reading frame	V1512	S
		Ala5>Thr	V1608	I
		Val102>Ala Glu144>Gly	V1607 V1608	I I

Примечание: S – чувствительный, I – умеренно устойчивый.

Note: S – sensitive, I – intermediately resistant.

У полностью чувствительного к гентамицину штамма *B. pseudomallei* V1512 в гене AAC (6')-III обнаружена делеция GC, повлекшая замену Leu106Val и сдвиг рамки считывания с образованием аномально длинного продукта за счет смещения стоп-кодона в область соседней CDS. У штаммов V1607 и V1608 с промежуточной чувствительностью к гентамицину в этом гене присутствуют две (Val102Ala и Glu144Gly) и три миссенс-мутации (Ala5Thr, Val102Ala и Glu144Gly) соответственно (табл. 2, рисунок, D).

В периплазматическом адаптере неохарактеризованного эффлюкс-оперона семейства RND – гомологе BPSL2234 – у всех исследованных штаммов обнаружены две идентичные замены Ala396Asp и Ser416Pro, у штамма *B. pseudomallei* V1512 дополнительно присутствовали три миссенс-мутации Met68Ile, Arg102His, Ala123Thr и делеция двух остатков аланина (ProAlaAla395Pro). В гипотетическом транспортёре семейства AcrB/AcrD/AcrF (гомолог BPSL2235), имеющем сходство с транспортёром эффлюкса аминогликозидов AcrD *Escherichia coli* [17], у *B. pseudomallei* V1512 присутствовала замена Arg208His, а у двух штаммов с промежуточной чувствительностью – Leu303Arg (табл. 2, рисунок, E).

Проведенное исследование спектра мутаций в потенциальных детерминантах резистентности к аминогликозидам, выявленных у штаммов *B. pseudomallei* с различным уровнем резистентности к гентамицину, расширило представление об известном механизме естественной резистентности возбудителя мелиоидоза к аминогликозидам, опосредованном эффлюксом AmrAB-OprA. В частности, показано, что чувствительность к гентамицину возникает не только при полной делеции оперона или при наличии аминокислотных замен и коротких делеций в транспортёре AmrB, но и в случаях мутаций в периплазматическом адаптере AmrA. Также обнаружено, что при дефектном AmrA уровень устойчивости к гентамицину может быть частично компенсирован за счет мутаций в репрессоре AmrR, вероятно, вследствие конститутивной экспрессии оперона. Кроме того, впервые показано возможное участие в формировании резистентности к гентамицину неохарактеризованного эффлюкс-оперона семейства RND (BPSL2234_BPSL2235_BPSL2236) и аминогликозид-6'-N-ацетилтрансферазы AAC (6')-III.

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

References / Список литературы

1. Trunck L.A., Propst K.L., Wuthiekanun V., Tuanyok A., Beckstrom-Sternberg S.M., Beckstrom-Sternberg J.S., Peacock S.J., Keim P., Dow S.W., Schweizer H.P. Molecular basis of rare aminoglycoside susceptibility and pathogenesis of *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates from Thailand. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009; 3(9):e519. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000519.
2. Podin Y., Sarovich D.S., Price E.P., Kaestli M., Mayo M., Hii K., Ngian H., Wong S., Wong I., Wong J., Mohan A., Ooi M., Fam T., Wong J., Tuanyok A., Keim P., Giffard P.M., Currie B.J. *Burkholderia pseudomallei* isolates from Sarawak, Malaysian Borneo, are predominantly susceptible to aminoglycosides and macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(1):162–6. DOI: 10.1128/AAC.01842-13.

3. Sia T.L.L., Mohan A., Ooi M.H., Chien S.L., Tan L.S., Goh C., Pang D.C.L., Currie B.J., Wong J.S., Podin Y. Corrigendum to: Epidemiological and clinical characteristics of melioidosis caused by gentamicin-susceptible *Burkholderia pseudomallei* in Sarawak, Malaysia. *Open Forum Infect. Dis.* 2022; 9(2):ofab653. DOI: 10.1093/ofid/ofab653.
4. Mohan A., Podin Y., Tai N., Chieng C.H., Rigas V., Machunter B., Mayo M., Wong D., Chien S.L., Tan L.S., Goh C., Bantin R., Mijen A., Chua W.Y., Hii K.C., Wong S.C., Ngian H.U., Wong J.S., Hashim J., Currie B.J., Ooi M.H. Pediatric melioidosis in Sarawak, Malaysia: Epidemiological, clinical and microbiological characteristics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(6):e0005650. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005650.
5. Moore R.A., DeShazer D., Reckseidler S., Weissman A., Woods D.E. Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43(3):465–70. DOI: 10.1128/AAC.43.3.465.
6. Viktorov D.V., Zakharova I.B., Podshivalova M.V., Kalinkina E.V., Merinova O.A., Ageeva N.P., Antonov V.A., Merinova L.K., Alekseev V.V. High-level resistance to fluoroquinolones and cephalosporins in *Burkholderia pseudomallei* and closely related species. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102 Suppl 1:S103–10. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70025-7.
7. Bugrysheva J.V., Sue D., Gee J.E., Elrod M.G., Hoffmaster A.R., Randall L.B., Chirakul S., Tuanyok A., Schweizer H.P., Weigel L.M. Antibiotic resistance markers in *Burkholderia pseudomallei* strain Bp1651 identified by genome assembly analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(6):e00010–17. DOI: 10.1128/AAC.00010-17.
8. Chaisson M.J., Pevzner P.A. Short read fragment assembly of bacterial genomes. *Genome Res.* 2008; 18(2):324–30. DOI: 10.1101/gr.7088808.
9. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
10. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K.D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(14):6614–24. DOI: 10.1093/nar/gkw569.
11. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempe C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(W1):W296–W303. DOI: 10.1093/nar/gky427.
12. Podnecky N.L., Rhodes K.A., Schweizer H.P. Efflux pump-mediated drug resistance in *Burkholderia*. *Front. Microbiol.* 2015; 6:305. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00305.
13. Chan Y.Y., Tan T.M., Ong Y.M., Chua K.L. BpeAB-OprB, a multidrug efflux pump in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48(4):1128–35. DOI: 10.1128/AAC.48.4.1128-1135.2004.
14. Podnecky N.L., Wuthiekanun V., Peacock S.J., Schweizer H.P. The BpeEF-OprC efflux pump is responsible for widespread trimethoprim resistance in clinical and environmental *Burkholderia pseudomallei* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(9):4381–6. DOI: 10.1128/AAC.00660-13.
15. Nehme D., Li X.Z., Elliot R., Poole K. Assembly of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of mutations in mexA compromising MexA multimerization and interaction with MexB. *J. Bacteriol.* 2004; 186(10):2973–83. DOI: 10.1128/JB.186.10.2973-2983.2004.
16. Mima T., Schweizer H.P. The BpeAB-OprB efflux pump of *Burkholderia pseudomallei* 1026b does not play a role in quorum sensing, virulence factor production, or extrusion of aminoglycosides but is a broad-spectrum drug efflux system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(8):3113–20. DOI: 10.1128/AAC.01803-09.
17. Rosenberg E.Y., Ma D., Nikaido H. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J. Bacteriol.* 2000; 182(6):1754–6. DOI: 10.1128/JB.182.6.1754-1756.2000.

Authors:

Chirskov P.R., Ustinov D.V., Viktorov A.D., Zakharova I.B. Volgograd Plague Control Research Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Bui T.L.A. Joint Vietnam-Russia Tropical Science and Technology Research Center. Hanoi, Vietnam.

Об авторах:

Чирсков П.Р., Устинов Д.В., Викторов А.Д., Захарова И.Б. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Буй Т.Л.А. Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр. Социалистическая Республика Вьетнам, Ханой.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-164-169

УДК 616.98:578.834.1

А.В. Шиповалов, Г.А. Кудров, А.А. Томилов, С.А. Боднев, Н.Д. Болдырев, А.С. Овчинникова,
А.В. Зайковская, О.С. Таранов, Е.К. Ивлева, О.В. Пьянков, Р.А. Максюттов

Патогенность вызывающих обеспокоенность вариантов вируса SARS-CoV-2 для сирийского хомячка

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Российская Федерация

Целью работы является изучение патогенности различных генетических вариантов вируса SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка. **Материалы и методы.** В работе использовали штаммы вируса SARS-CoV-2, относящиеся к вызывающим обеспокоенность (VOC) вариантам, циркулирующим на территории РФ. Эксперименты проводили на аутбредных сирийских хомячках, полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор». Инфекционный титр коронавируса в образцах тканей, полученных от зараженных лабораторных животных, определяли на культуре клеток Vero E6. Дополнительным параметром контроля вирусной нагрузки в пробах считали пороговое значение Ct в ОТ-ПЦР. Тяжесть поражения тканей легких сирийских хомячков при подобном COVID-19 заболевании оценивали по гистологическим препаратам. **Результаты и обсуждение.** Определены 50 % инфицирующие дозы при интраназальном способе заражения, проведен гистологический анализ тканей легкого. Оценена патогенность различных вариантов вируса SARS-CoV-2 для сирийского хомячка, выявлены различия инфицирующих доз и патологических изменений в легких. Вирусы SARS-CoV-2, относящиеся к генетическому варианту бета, характеризуются наибольшей, а к варианту альфа – наименьшей вирулентностью при сравнении по величине ИД₅₀. Варианты дельта и омикрон обладают сравнимой способностью вызывать специфическое поражение тканей дыхательных путей, при этом уступая только варианту бета. Показано, что сирийские хомячки являются адекватной моделью для оценки патогенности вызывающих обеспокоенность вариантов вируса SARS-CoV-2. Таким образом, варианты VOC вируса SARS-CoV-2 при интраназальном заражении показали разную степень патогенности в модели сирийского хомячка.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, вызывающие обеспокоенность варианты (VOC), сирийский хомячок, 50 % инфицирующая доза, интраназальное заражение, модельное животное.

Корреспондирующий автор: Шиповалов Андрей Владимирович, e-mail: shipovalov_av@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Томилов А.А., Боднев С.А., Болдырев Н.Д., Овчинникова А.С., Зайковская А.В., Таранов О.С., Ивлева Е.К., Пьянков О.В., Максюттов Р.А. Патогенность вызывающих обеспокоенность вариантов вируса SARS-CoV-2 для сирийского хомячка. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 3:164–169. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-164-169

Поступила 10.02.2022. Отправлена на доработку 14.02.2022. Принята к публ. 28.06.2022.

A.V. Shipovalov, G.A. Kudrov, A.A. Tomilov, S.A. Bodnev, N.D. Boldyrev, A.S. Ovchinnikova,
A.V. Zaikovskaya, O.S. Taranov, E.K. Ivleva, O.V. P'yankov, R.A. Maksyutov

Pathogenicity of the SARS-CoV-2 Virus Variants of Concern for the Syrian Golden Hamster

State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to study the pathogenicity of newly emerging variants of SARS-CoV-2 on the model of the Syrian golden hamster. **Materials and methods.** We used the strains of SARS-CoV-2 virus related to the VOC circulating in the territory of the Russian Federation. The experiments were carried out on outbred Syrian hamsters obtained from the nursery of the SSC VB "Vector". The infectious titer of coronavirus in tissue samples collected from infected laboratory animals was determined on a Vero E6 cell culture. The Ct in RT-PCR was considered an additional parameter for monitoring the viral load in the samples. The severity of lung tissue damage in Syrian hamsters with COVID-19 was assessed by histological preparations. **Results and discussion.** 50 % infecting doses in case of the intranasal infection have been determined, histological analysis of lung tissues performed. The pathogenicity of various variants of the SARS-CoV-2 virus for the Syrian hamster has been evaluated, differences in infecting doses and pathological changes in the lungs have been revealed. SARS-CoV-2 viruses belonging to Beta genetic variant have the highest virulence, while Alpha variant has the lowest one when comparing the studied strains by the ID₅₀ value. The Delta and Omicron variants have a matched ability to cause specific damage to the tissues of the respiratory tract, while being inferior only to the Beta variant. It has been demonstrated that Syrian hamsters are an adequate model for assessing the pathogenicity of the SARS-CoV-2 virus variants of concern. Variants of SARS-CoV-2 virus during intranasal infection has shown different degree of pathogenicity in the Syrian hamster model.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, variants of concern (VOC), Syrian golden hamster, 50 % infecting dose, intranasal infection, model animal.

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

Corresponding author: Andrey V. Shipovalov, e-mail: shipovalov_av@vector.nsc.ru.

Citation: Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Tomilov A.A., Bodnev S.A., Boldyrev N.D., Ovchinnikova A.S., Zaikovskaya A.V., Taranov O.S., Ivleva E.K., P'yankov O.V., Maksyutov R.A. Pathogenicity of the SARS-CoV-2 Virus Variants of Concern for the Syrian Golden Hamster. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:164–169. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-164-169

Received 10.02.2022. Revised 14.02.2022. Accepted 28.06.2022.

Shipovalov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1201-8307>
Kudrov G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8251-7040>
Tomilov A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5311-9783>
Bodnev S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0599-3817>
Boldyrev N.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8854-0287>
Ovchinnikova A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1745-7643>

Zaikovskaya A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>
Taranov O.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
Ivleva E.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1194-7219>
P'yankov O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>
Maksyutov R.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>

В конце декабря 2019 г. необычная пневмония возникла у людей в г. Ухань (КНР) и быстро распространилась по всему миру, что вызвало глобальные проблемы общественного здравоохранения. Возбудитель идентифицирован как новый коронавирус [1] и назван коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) на основе филогенетического анализа родственных коронавирусов, проведенного исследовательской группой Международного комитета по таксономии вирусов. Впоследствии заболевание, вызываемое этим вирусом, обозначено ВОЗ как коронавирусная болезнь 2019 г. (COVID-19). Несмотря на значительные усилия, болезнь все еще распространяется [2].

Высокая заболеваемость и смертность, связанные с пандемией COVID-19, сделали разработку вакцин и противовирусных препаратов глобальным приоритетом для органов здравоохранения. Благодаря беспрецедентно быстрой разработке вакцин удалось заметно снизить заболеваемость и смертность от этой инфекции. Однако с появлением новых вызывающих обеспокоенность вариантов вируса SARS-CoV-2 возникла вероятность уменьшения чувствительности к терапевтическим препаратам, снижения связывающей активности нейтрализующих антител, приобретенных как после заболевания более ранним вариантом SARS-CoV-2, так и после вакцинации [3].

Исследования на животных играют важную роль в характеристике патогенеза вирусных инфекций и оценке противовирусных препаратов и вакцин. Используемые животные модели должны быть восприимчивыми к исследуемому возбудителю и воспроизводить клиническое течение и патологию, наблюдаемые у людей [4].

По мнению ряда авторов, сирийские хомячки лучше подходят для изучения репликации вируса SARS-CoV-2 в тканях верхних и нижних дыхательных путей, для понимания патогенеза и защитных реакций организма, наблюдаемых у людей, а также для тестирования вакцин и противовирусных препаратов [5], являясь более чувствительной лабораторной моделью, чем мыши [6].

Хомячки имеют относительно высокую степень гомологии с людьми в области клеточного рецептора, которым является ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2), при взаимодействии с S-белком вируса SARS-CoV-2. У сирийских хомячков после заражения отмечали потерю веса, эффективную репликацию вируса в слизистой оболочке носа и эпителиальных клетках нижних дыхательных пу-

тей, регистрировали заметные поражения легких в виде отека, воспаления и гибели клеток, что было оценено с использованием гистологических методов [7], в сыворотке крови переболевших хомячков выявляли нейтрализующие антитела. Кроме того, показано, что вирус передается от инфицированных животных при совместном содержании интактным хомячкам либо аэрозольно, либо через контаминированные поверхности, что указывает на их адекватность в качестве модели для изучения трансмиссивности вируса SARS-CoV-2. У контактных животных, инфицированных при совместном содержании, наблюдались аналогичные признаки патологии легких, но они не теряли вес, что позволяет предположить, что интраназально зараженные хомячки имели более тяжелую форму заболевания из-за большего количества вируса, попавшего в легкие [8].

Цель работы – исследование патогенности вызывающих обеспокоенность вариантов (VOC) вируса SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка с определением величины 50 % инфицирующей дозы (ID_{50}) и гистологическим анализом повреждений тканей легкого животных после интраназального заражения. Полученные данные могут быть использованы для оценки пандемического потенциала генетических вариантов коронавируса, выделенных на территории РФ.

Материалы и методы

Вирусы. В работе исследовали штаммы вируса SARS-CoV-2, относящиеся к вызывающим обеспокоенность вариантам, циркулирующим на территории РФ. Данные штаммы получены из Государственной коллекции микроорганизмов ГНЦ ВБ «Вектор». Как референс использовали штамм hCoV-19/Australia/VIC01/2020, полученный из Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory (Мельбурн, Австралия). Полный перечень исследованных штаммов с указанием ID их нуклеотидных последовательностей в базе данных GISAID (<https://www.gisaid.org>) и значимых мутаций в RBD S-белка, ответственных за увеличение патогенности, приведен в табл. 1.

Использованные в работе варианты вируса SARS-CoV-2 выделены в культуре клеток Vero E6, аликвоты вируса из одной наработки (стока) были заморожены и хранились при температуре минус 70 °C. Инфекционный титр стоков составлял не менее 10^6 ЦПД₅₀/мл. В каждом эксперименте использовали новую аликвоту из одного стока.

Таблица 1 / Table 1

Перечень используемых штаммов
List of strains used

Штамм Strain	№ штамма в базе данных GISAID GISAID ID	Генетическая линия Genetic lineage	Название варианта, вызывающего обеспокоенность Variant of concern (VOC)	Значимые мутации Significant mutations
hCoV-19/Australia/VIC01/2020	EPI_ISL_406844	B	ухань Wuhan	Референс Reference
hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020	EPI_ISL_6565012	B.1.1.7	альфа Alpha	N501Y D614G
hCoV-19/Russia/MOS-SAB-1502/2021	EPI_ISL_6492245	B.1.351	бета Beta	E484K N501Y D614G
hCoV-19/Russia/MOS-2406/2021	EPI_ISL_7338789	AY.122	дельта Delta	D614G
hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021	EPI_ISL_8920444	BA.1	омикрон Omicron	E484A N501Y D614G

Культуры клеток. Клетки Vero и Vero E6 получены из коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор», выращены в минимальной среде (MEM), содержащей 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США), пенициллин (100 МЕ/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл; Gibco, США) при температуре 37 °C и 5 % содержании CO₂. После инфицирования клеток использовали аналогичную среду, только с 2 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота.

Содержание животных. В эксперименте использовали самцов и самок беспородных сирийских хомячков массой тела 80–100 г. Животные получены из Питомника лабораторных животных ГНЦ ВБ «Вектор». Хомячкам подкожно имплантировали транспонеры (чипы) IPTT-300 (BMDS, США) для бесконтактного измерения температуры и идентификации ID и помещали по два в индивидуально вентилируемые клетки. Животные имели неограниченный доступ к пище и воде. Акклиматизация к условиям эксперимента проведена в течение семи дней до заражения. Во время экспериментов температура в клетках поддерживалась 22–24 °C, а относительная влажность – 40–55 %. Хомячков взвешивали, измеряли температуру и оценивали клинические признаки болезни ежедневно.

Все эксперименты на животных одобрены Биоэтическим комитетом ГНЦ ВБ «Вектор» и проводились в соответствии с национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных.

Определение вирулентности (ИД₅₀) генетических вариантов вируса SARS-CoV-2 на сирийских хомячках. Животные разделены на 6 групп по 12 голов из расчета одна группа на одно 10-кратное разведение вируса. Заражение предварительно анестезированных внутримышечным введением Zoletil 100 (Virbac, Франция) животных производили интраназально инокуляцией вируса пипеткой в объеме 50 мкл, в дозах 0,5; 1,5; 2,5 и 3,5 lg ЦПД₅₀. Через 120 часов после заражения (ПЗ) все животные подвергались эвтаназии методом трансервикальной

дислокации. Производили вскрытие, забор тканей носовых ходов и легких. Полученные с помощью шариковой мельницы (Analytical Jena, Германия) 10 % гомогенаты тканей осветляли путем центрифугирования при 10000 об/мин (ротатор SW28, Beckman Coulter, High Wycombe, Великобритания). Аликвоты осветленных образцов использовали для определения количества РНК вируса в образцах методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, через суррогатный показатель Ct и для определения концентрации в ЦПД₅₀/мл инфекционного вируса методом титрования на культуре клеток Vero E6.

Определение РНК вируса SARS-CoV-2 в биологических образцах методом ПЦР. Выделение РНК проводили набором «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия). Синтез кДНК на матрице выделенной РНК проводили с использованием реагентов для реакции обратной транскрипции «Реверта-Л» (ЦНИИЭ, Россия). Для амплификации фрагментов кДНК вируса SARS-CoV-2 использовали тест-систему «Вектор-ПЦРРБ-COVID19-RG» (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия). Результаты исследования интерпретировали в соответствии с инструкцией производителя.

Титрование вирусов. Инфекционную активность вирусов в стоках, носовых смывах и тканях легких инфицированных животных определяли с использованием метода анализа 50 % инфекционной дозы для культуры тканей. Клетки Vero E6 высевали за 24 часа до заражения в 96-луночные планшеты с посевной дозой 1,5·10⁴ клетки/лунка. В день эксперимента сделаны последовательные 10-кратные разведения вируса. Шесть лунок 96-луночного планшета заражены каждым разведением вируса. После 72-часовой инкубации в атмосфере 5 % CO₂ при температуре 37 °C клетки фиксировали 4 % раствором параформальдегида с последующим окрашиванием 0,1 % кристаллическим фиолетовым. Специфическое поражение монослоя культуры клеток в лунке учитывали и выражали через 50 % цитопатическое действие (ЦПД₅₀). Значение инфекционной дозы при интраназальном заражении рассчитывали по методу Рида – Менча [9].

Гистологические исследования. Забор органов от инфицированных животных осуществляли через 120 часов ПЗ. Образцы фиксировали в 10 % растворе забуференного формалина для гистологических исследований («БиоВитрум», Россия) в течение 48 часов. Обработку материала проводили по общепринятой методике: последовательное обезживание в спиртах возрастающей концентрации, пропитывание в смеси ксилол – парафин и заливка в парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм готовили с помощью автоматического ротационного микротомы HM-360 (Thermo Fisher, Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование и микрофотосъемку проводили на микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss, Германия) с использованием программного пакета к прибору версии AxioVision 4.8.2. Оценку распространенности и степени выраженности патологических проявлений инфекции проводили при анализе сканов серийных срезов, полученных на цифровом сканере микропрепаратов Olympus SlideView VS200 (Olympus, Германия; программный пакет VS200ASW 3.2).

Статистическую обработку результатов проводили программой Statistica v13.0.

Результаты и обсуждение

Через 120 часов после заражения в гомогенатах легких и носовой полости инфицированных жи-

вотных определена вирусная нагрузка с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени и методом титрования инфекционного вируса на культуре клеток Vero E6 по ЦПД₅₀. В табл. 2 представлены результаты оценки патогенности различных инфицирующих доз для пяти вариантов вируса SARS-CoV-2 после интраназального заражения сирийских хомячков.

Анализ полученных результатов не показал достоверного снижения вирусной нагрузки в тканях хомячков, зараженных вариантом омикрон, в сравнении с предшествующим вариантом дельта. При этом значения Ct и инфекционного титра, полученные для VOC омикрон, позволяют говорить о большей патогенности, чем у варианта ухань и VOC альфа. Кроме того, в отличие от предыдущих вариантов, у варианта омикрон на пятые сутки после интраназального заражения вирусная нагрузка и титр инфекционного вируса значительно выше в носовой полости, чем в легких. Этим может объясняться его повышенная способность к передаче инфекции при контакте.

Для оценки вирулентности вызывающих беспокойство вариантов вируса SARS-CoV-2 мы определили значение инфицирующей дозы ИД₅₀ при интраназальном способе заражения сирийских хомячков для референс-штамма и четырех вариантов VOC: альфа, бета, дельта и омикрон. ИД₅₀ для пяти вариантов вируса SARS-CoV-2, определенная по наличию вируса в тканях носовых ходов и/или легких хомячков, представлена в табл. 3.

Таблица 2 / Table 2

Определение патогенности различных инфицирующих доз для пяти вариантов вируса SARS-CoV-2 при интраназальном заражении сирийских хомячков

Determination of pathogenicity of various infecting doses for five variants of SARS-CoV-2 virus during intranasal infection of Syrian hamster

Генетические варианты Genetic variants		Ухань Wuhan		Альфа Alpha		Бета Beta		Дельта Delta		Омикрон Omicron	
Инф. титр стока штамма (ЦПД ₅₀ /мл) Titer of a virus stock (TCID ₅₀ /ml)		5,55 lg		6,05 lg		6,0 lg		6,0 lg		5,65 lg	
разведение dilution	параметр parameter	носовые ходы nasal passages	легкие lungs	носовые ходы nasal passages	легкие lungs	носовые ходы nasal passages	легкие lungs	носовые ходы nasal passages	легкие lungs	носовые ходы nasal passages	легкие lungs
–7	Ct*	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0	32,20±9,16	34,31±6,61	40,00±0	40,00±0	40,00±0	40,00±0
	Тинф** / Tinf	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
–6	Ct	40,00±0	40,00±0	28,07±14,65	35,29±9,43	16,75±4,01	24,26±11,29	29,34±12,31	29,71±11,91	40,00±0	40,00±0
	Тинф / Tinf	≤0,5	≤0,5	1,5±0,0	≤0,5	3,0±0,0	2,5±0,5	1,5±0,0	1,5±0,0	≤0,5	≤0,5
–5	Ct	40,00±0	40,00±0	18,63±7,42	23,14±10,50	15,41±0,67	17,39±1,82	18,96±1,24	18,61±1,85	40,00±0	40,00±0
	Тинф / Tinf	≤0,5	≤0,5	2,5±0,0	2,5±0,0	≤0,5	≤0,5	2,5±0,0	2,5±0,0	≤0,5	≤0,5
–4	Ct	40,00±0	40,00±0	13,70±2,36	12,56±0,90	12,53±1,26	16,65±1,36	19,97±1,36	21,88±2,51	26,32±13,33	31,32±6,72
	Тинф / Tinf	≤0,5	≤0,5	3,5±0,5	3,5±0,0	3,5±0,0	3,5±0,5	3,0±0,0	3,0±0,0	2,5±0,0	1,5±0,0
–3	Ct	35,74±6,27	36,86±4,53	14,81±1,49	13,88±2,38	13,05±1,12	16,59±3,78	18,79±1,74	20,65±2,14	13,12±1,36	17,21±4,46
	Тинф / Tinf	≤0,5	≤0,5	3,5±0,0	3,5±0,0	3,5±0,0	3,5±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,5±0,0	3,5±0,5
–2	Ct	29,67±8,21	31,99±4,87	13,04±1,04	14,77±1,27	13,99±1,34	17,13±6,35	13,54±0,80	12,49±0,84	16,65±2,78	23,24±3,22
	Тинф / Tinf	1,5±0,0	1,5±0,0	3,5±0,0	3,5±0,0	3,5±0,0	3,5±0,5	3,5±0,0	3,5±0,0	3,5±0,0	3,0±0,0

Примечания: *Ct – cycle threshold. Значение Ct=40,00 принимали за отрицательное; **Тинф – инфекционный титр (lg ЦПД₅₀/мл). Значение ≤0,5lg – пороговое значение метода титрования инфекционного вируса по ЦПД.

Notes: *Ct – cycle threshold. Ct value>40.00, was taken as negative **Tinf – infectious titer (lg TCID₅₀/ml). The limit of detection of an infectious virus in samples by titration on Vero E6 cell culture ≤0,5lg TCID₅₀/ml.

Таблица 3 / Table 3

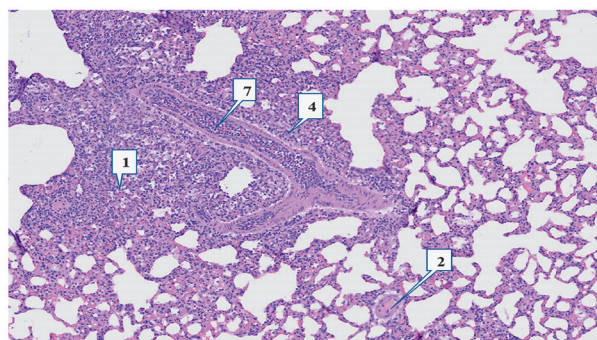
ИД₅₀ пяти вариантов вируса SARS-CoV-2 для интраназально зараженных сирийских хомячков
 50 % infectious dose (ID₅₀) of five variants of the SARS-CoV-2 virus for intranasally infected by Syrian hamsters

Штамм / вариант SARS-CoV-2 Strain / variant of SARS-CoV-2	Ухань Wuhan	Альфа Alpha	Бета Beta	Дельта Delta	Омикрон Omicron
ИД ₅₀ , ЦПД ₅₀ , p=0,05	7,8	13,2	0,6	1,1	1,3
ID ₅₀ , TCID ₅₀ , p=0,05	[2,2÷19,8]	[3,7÷30,1]	[0,1÷1,0]	[0,21÷5,10]	[0,23÷5,81]

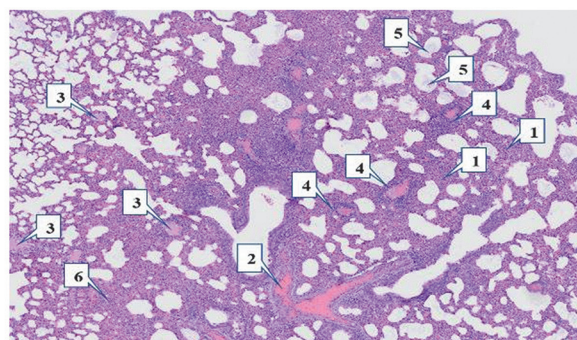
Сравнительный анализ данных по величине ИД₅₀ показывает, что наиболее вирулентен вариант бета вируса SARS-CoV-2 (меньшее количество инфекционного вируса требуется для инфицирования), наименее – вариант альфа, имеющий в ~1,5 раза большее значение 50 % инфицирующей дозы в сравнении с референс-штаммом. Варианты дельта и омикрон обладают сравнимой способностью вызывать специфическое поражение тканей дыхательных путей, при этом уступая только варианту бета.

Для получения более детального представления о поражении легких, вызванного действием коронавируса изучаемых генетических вариантов, проведены гистологические исследования. Сканы срезов ткани легких сирийских хомячков, интраназально инфицированных вариантами вируса SARS-CoV-2, представлены на рисунке.

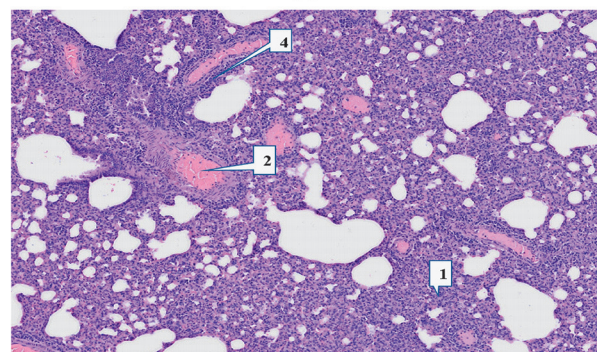
Наибольшее количество патологических изменений и максимальная площадь поражения ткани легких наблюдались в группе инфицированных



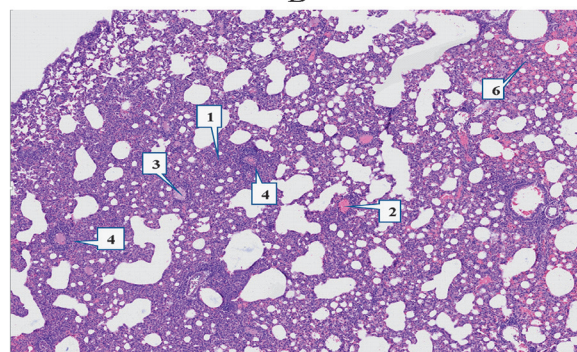
A



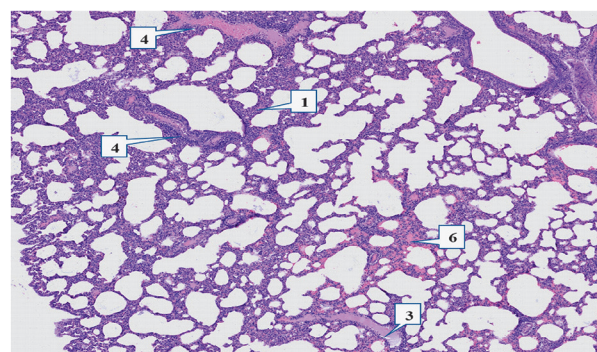
B



C



D



E

Гистологический срез легкого сирийского хомячка, окрашенный гематоксилином и эозином. Заражение интраназально дозой 3,5 lg ЦПД₅₀ штаммом варианта ухань (А), альфа (В), бета (С), дельта (D) и омикрон (E):

1 – консолидация паренхимы легкого, утолщение межальвеолярных перегородок за счет отека и воспалительной инфильтрации; 2 – явления застоя – полнокровные сосуды, в том числе капилляры, сладж эритроцитов; 3 – плазма в просвете сосудов; 4 – периваскулярная воспалительная инфильтрация; 5 – детрит, следы отечной жидкости в полости альвеол; 6 – явления плазморрагии; 7 – скопление лейкоцитов в просвете кровеносного сосуда (лейкостаз)

Histological section of a Syrian hamster lung stained with hematoxylin and eosin. Intranasal infection with a dose of 3.5 lg CPD50 with a strain of the Wuhan variant (A), Alpha (B), Beta (C), Delta (D), and Omicron (E):

1 – consolidation of the lung parenchyma, thickening of the interalveolar septa due to edema and inflammatory infiltration; 2 – stagnation phenomena – vascular fullness, including capillaries, erythrocyte sludge; 3 – plasma in the vascular lumen; 4 – perivascular inflammatory infiltration; 5 – detritus, traces of edematous fluid in the alveolar cavity; 6 – plasmorrhagia phenomena; 7 – accumulation of leukocytes in the lumen of blood vessel (leukostasis)

вариантом бета (рисунок, С). Преобладающим был признак клеточной инфильтрации и отека стенок альвеол. Вариант дельта имел схожую патологическую картину (рисунок, D), при этом отмечено более интенсивное проявление признака плазморрагии. Вариант альфа (рисунок, В) и референс-штамм ухань (рисунок, А) имели признаки очаговой консолидации легочной ткани с суммарно меньшей площадью, чем при заражении другими VOC-вариантами. В легких, пораженных вариантом омикрон, признак консолидации отсутствовал, отмечены инфильтрация стенок альвеол, явления плазморрагии и отека с меньшей степенью выраженности, чем у вариантов дельта и бета.

Результаты гистологических исследований тяжести поражения ткани легких сирийских хомячков, интраназально инфицированных разными вариантами вируса SARS-CoV-2, в некоторой степени коррелируют с значениями ИД₅₀. Например, более вирулентный вариант бета с ИД₅₀, равной всего 0,6 ЦПД₅₀, вызывает более тяжелые повреждения легких сирийских хомячков.

В нашем исследовании VOC-варианты вируса SARS-CoV-2 при интраназальном заражении показали разную степень патогенности в модели сирийского хомячка. Выявленные различия инфицирующих доз и патологических изменений в легких позволяют нам сравнить патогенность различных генетических вариантов VOC с исходным штаммом вируса SARS-CoV-2.

Результаты исследования способствуют накоплению новых данных о патогенезе инфекционного процесса, обусловленного различными вариантами вируса SARS-CoV-2, и позволяют совершенствовать этап доклинической оценки разрабатываемых препаратов для профилактики и терапии COVID-19 на модели сирийского хомячка.

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

Список литературы

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 2020; 4:536–44. DOI: 10.1038/s41564-020-0695-z.
2. WHO – Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Situation Reports. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---25-may-2022> (дата обращения 01.06.2022).
3. Li Q., Nie J., Wu J., Zhang L., Ding R., Wang H., Zhang Y., Li T., Liu S., Zhang M., Zhao C., Liu H., Nie L., Qin H., Wang M., Lu Q., Li X., Liu J., Liang H., Shi Y., Shen Y., Xie L., Zhang L., Qu X., Xu W., Huang W., Wang Y. SARS-CoV-2 501Y.V2 variants lack higher infectivity but do have immune escape. *Cell.* 2021; 9:2362–71.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2021.02.042.
4. Sutton T.C., Subbarao K. Development of animal models against emerging coronaviruses: From SARS to MERS coronavirus. *Virology.* 2015; 479-480:247–58. DOI: 10.1016/j.virol.2015.02.030.
5. Kumar S., Yadav P.K., Srinivasan R., Perumal N. Selection of animal models for COVID-19 research. *Virusdisease.* 2020; 31(4):453–58. DOI: 10.1007/s13337-020-00637-4.

6. Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Томилов А.А., Боднев С.А., Болдырев Н.Д., Овчинникова А.С., Зайковская А.В., Таранов О.С., Пьянков О.В., Максютков Р.А. Изучение восприимчивости линий мышей к вызывающим обеспокоенность вариантам вируса SARS-CoV-2. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; 1:148–55. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-148-155.
7. Chan J.F., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K., Chan C.C., Lee A.C., Chan W.M., Fan Z., Tsoi H.W., Wen L., Liang R., Cao J., Chen Y., Tang K., Luo C., Cai J.P., Kok K.H., Chu H., Chan K.H., Sridhar S., Chen Z., Chen H., To K.K., Yuen K.Y. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a golden syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 9:2428–46. DOI: 10.1093/cid/ciaa325.
8. Sia S.F., Yan L.M., Chin A.W.H., Fung K., Choy K.T., Wong A.Y.L., Kaewpreedee P., Perera R.A.P.M., Poon L.L.M., Nicholls J.M., Peiris M., Yen H.L. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature.* 2020; 583(7818):834–8. DOI: 10.1038/s41586-020-2342-5.
9. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 3:493–7. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

References

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 2020; 4:536–44. DOI: 10.1038/s41564-020-0695-z.
2. WHO – Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Situation Reports. (Cited 01.06.2022). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---25-may-2022>.
3. Li Q., Nie J., Wu J., Zhang L., Ding R., Wang H., Zhang Y., Li T., Liu S., Zhang M., Zhao C., Liu H., Nie L., Qin H., Wang M., Lu Q., Li X., Liu J., Liang H., Shi Y., Shen Y., Xie L., Zhang L., Qu X., Xu W., Huang W., Wang Y. SARS-CoV-2 501Y.V2 variants lack higher infectivity but do have immune escape. *Cell.* 2021; 9:2362–71.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2021.02.042.
4. Sutton T.C., Subbarao K. Development of animal models against emerging coronaviruses: From SARS to MERS coronavirus. *Virology.* 2015; 479-480:247–58. DOI: 10.1016/j.virol.2015.02.030.
5. Kumar S., Yadav P.K., Srinivasan R., Perumal N. Selection of animal models for COVID-19 research. *Virusdisease.* 2020; 31(4):453–58. DOI: 10.1007/s13337-020-00637-4.
6. Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Tomilov A.A., Bodnev S.A., Boldyrev N.D., Ovchinnikova A.S., Zaikovskaya A.V., Taranov O.S., P'yankov O.V., Maksyutov R.A. [Susceptibility to SARS-CoV-2 virus variants of concern in mouse models]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (1):148–55. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-148-155.
7. Chan J.F., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K., Chan C.C., Lee A.C., Chan W.M., Fan Z., Tsoi H.W., Wen L., Liang R., Cao J., Chen Y., Tang K., Luo C., Cai J.P., Kok K.H., Chu H., Chan K.H., Sridhar S., Chen Z., Chen H., To K.K., Yuen K.Y. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a golden syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 9:2428–46. DOI: 10.1093/cid/ciaa325.
8. Sia S.F., Yan L.M., Chin A.W.H., Fung K., Choy K.T., Wong A.Y.L., Kaewpreedee P., Perera R.A.P.M., Poon L.L.M., Nicholls J.M., Peiris M., Yen H.L. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature.* 2020; 583(7818):834–8. DOI: 10.1038/s41586-020-2342-5.
9. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 3:493–7. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

Authors:

Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Tomilov A.A., Bodnev S.A., Boldyrev N.D., Ovchinnikova A.S., Zaikovskaya A.V., Taranov O.S., Ivleva E.K., P'yankov O.V., Maksyutov R.A. State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Об авторах:

Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Томилов А.А., Боднев С.А., Болдырев Н.Д., Овчинникова А.С., Зайковская А.В., Таранов О.С., Ивлева Е.К., Пьянков О.В., Максютков Р.А. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п.п. Колыцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-170-172

УДК 616.98:579.852.11

А.С. Низкородова^{1,2}, Э.Р. Мальцева², Ж.А. Бердыгулова², Д.А. Найзабаева², С.А. Куатбекова²,
А.В. Жигайлов^{1,2}, Н. Абдолла^{1,2}, А.С. Машжан², И.А. Ахметоллаев², Ю.А. Скиба², С.М. Мамадалиев²

Детекция *Bacillus anthracis* по генам профага lambda_Ba03 посредством ПЦР в реальном времени

¹РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», Алма-Ата, Республика Казахстан;

²Филиал РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии», Алма-Ата, Республика Казахстан

Цель исследования – разработка набора праймеров и флуоресцентных зондов для детекции двух хромосомных мишеней *Bacillus anthracis* методом ПЦР в реальном времени на основе генов профага lambda_Ba03. **Материалы и методы.** При BLAST-анализе хромосомной ДНК *B. anthracis* в качестве мишеней определены два гена профага lambdaBa03: BA_5358 (AE016879.1: 4852332..4853642) и BA_5361 (AE016879.1: 4855298..4856278). Разработанные праймеры и флуоресцентные гидролизующиеся зонды TaqMan для одновременной детекции хромосомной ДНК *B. anthracis* по двум указанным генам проверены в реакциях ПЦР в реальном времени на чувствительность и специфичность. **Результаты и обсуждение.** Проведенные исследования на образцах хромосомной ДНК близкородственных бактерий (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. clausii*) показали 100 % специфичность разработанных наборов праймеров/зондов. Чувствительность разработанного мультиплексного набора, исследованная на образцах ДНК вакцинного штамма м55-ВНИИВВиМ и архивных образцах ДНК *B. anthracis*, составила 100 фг бактериальной ДНК, что в пересчете определяет предел чувствительности в 16,72 бактериального генома на реакцию. Разработанный мультиплексный набор позволяет использовать его как отдельный инструмент для исследовательских лабораторий, изучающих сибирскую язву.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, ПЦР в реальном времени, lambdaBA_5358, lambdaBA_5361, сибирская язва.

Корреспондирующий автор: Низкородова Анна Сергеевна, e-mail: a.nizkorodova@imbb.org.kz.

Для цитирования: Низкородова А.С., Мальцева Э.Р., Бердыгулова Ж.А., Найзабаева Д.А., Куатбекова С.А., Жигайлов А.В., Абдолла Н., Машжан А.С., Ахметоллаев И.А., Скиба Ю.А., Мамадалиев С.М. Детекция *Bacillus anthracis* по генам профага lambda_Ba03 посредством ПЦР в реальном времени. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:170–172. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-170-172

Поступила 08.04.2022. Отправлена на доработку 16.05.2022. Принята к публ. 15.07.2022.

A.S. Nizkorodova^{1,2}, E.R. Mal'tseva², Zh.A. Berdygulova², D.A. Naizabaeva², S.A. Kuatbekova²,
A.V. Zhigailov^{1,2}, N. Abdolla^{1,2}, A.S. Mashzhan², I.A. Akhmetollaev², Yu.A. Skiba², S.M. Mamadaliev²

Real-Time PCR Detection of *Bacillus anthracis* by Lambda_Ba03 Prophage Genes

¹Institute of Molecular Biology and Biochemistry named after M.A. Aitkhozhin, Almaty, Republic of Kazakhstan;

²Almaty Branch of the National Center for Biotechnology, Almaty, Republic of Kazakhstan

Abstract. The aim of the study was to develop a set of primers and fluorescent probes for the detection of two chromosomal targets of *Bacillus anthracis* using real-time PCR based on the lambda_Ba03 prophage genes. **Materials and methods.** BLAST analysis of *B. anthracis* chromosomal DNA identified two target genes in the region of lambdaBa03 prophage, BA_5358 (AE016879.1: 4852332..4853642) and BA_5361 (AE016879.1: 4855298..4856278). The designed primers and fluorescent hydrolysable TaqMan probes for simultaneous detection of *B. anthracis* chromosomal DNA by two stated genes were tested in qPCR for sensitivity and specificity. **Results and discussion.** Studies performed on chromosomal DNA samples of closely related bacteria (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. clausii*) have shown 100 % specificity of the developed sets of primers/probes. The sensitivity of the devised multiplex kit, tested on DNA samples of the m55-VNIIVViM vaccine strain and archival DNA samples of *B. anthracis*, reached 100 fg of bacterial DNA, which sets the limit of sensitivity at 17 genomes per reaction. The developed multiplex kit can be used as a separate tool for research laboratories studying anthrax.

Key words: *Bacillus anthracis*, real-time PCR, lambdaBA_5358, lambdaBA_5361, anthrax.

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

Funding: The study was carried out within the framework of the program BR10764975 of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan.

Corresponding author: Anna S. Nizkorodova, e-mail: a.nizkorodova@imbb.org.kz.

Citation: Nizkorodova A.S., Mal'tseva E.R., Berdygulova Zh.A., Naizabaeva D.A., Kuatbekova S.A., Zhigailov A.V., Abdolla N., Mashzhan A.S., Akhmetollaev I.A., Skiba Yu.A., Mamadaliev S.M. Real-Time PCR Detection of *Bacillus anthracis* by Lambda_Ba03 Prophage Genes. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:170–172. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-170-172

Received 08.04.2022. Revised 16.05.2022. Accepted 15.07.2022.

Nizkorodova A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1597-7207>
Mal'tseva E.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9198-695X>
Berdygulova Zh.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0379-2472>
Naizabaeva D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0606-4289>
Kuatbekova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1091-0150>
Zhigailov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9646-033X>

Abdolla N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4769-7824>
Mashzhan A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9516-5566>
Akhetmetov I.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6219-4002>
Skiba Yu.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4895-1473>
Mamadaliyev S.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7767-0251>

Возбудителем сибирской язвы является грамположительная спорообразующая инкапсулированная бактерия *Bacillus anthracis*, характеризующаяся тем, что ее генетический материал, помимо хромосомы, включает две вирулентные плазмиды: рХО1 и рХО2 [1]. Эти плазмиды несут гены токсинов [2] и гены, отвечающие за синтез, деградацию и регуляцию капсулы. Последняя обладает антифагоцитарной активностью, препятствует фагоцитозу бактерий и способствует их фиксации на клетках хозяина [3].

Основной проблемой при разработке чувствительной и специфичной тест-системы является высокое сходство *B. anthracis* с *B. cereus* и *B. thuringiensis*; некоторые исследователи рассматривают их как изолаты одного вида из-за высокого генетического подобия [4]. Предлагаемые в настоящее время системы ПЦР для обнаружения *B. anthracis* основаны в основном на обнаружении мишеней, расположенных на мегаплазмидах рХО1 и рХО2. Такие тест-системы имеют высокую чувствительность; тем не менее существует также необходимость в одновременном обнаружении хромосомного маркера. Это связано с тем, что некоторые изолаты *B. anthracis* не содержат плазмид, а некоторые изолаты *B. cereus* и *B. thuringiensis* содержат рХО1 [5] или рХО2 [6]. В настоящее время предложен ряд хромосомных мишеней, но большинство из них не являются уникальными для *B. anthracis* [7].

Цель исследования – предложить новый вариант хромосомного маркера для *B. anthracis*, основанный на одновременном обнаружении двух генов-мишеней, уникальных для *B. anthracis*.

Материалы и методы

Штаммы *B. cereus* и *B. subtilis* получены у фирмы Liofilchem (Италия), *B. thuringiensis* – из Республиканской коллекции микроорганизмов (Астана, Казахстан), *B. clausii* – из медицинского препарата «Энтерожермина» («Санофи С.П.А.», Италия). Вакцинный штамм 55-ВНИИВВиМ приобретен в виде препарата «Вакцина против сибирской язвы животных из штамма 55-ВНИИВВиМ жидкая» (BIOTRON GROUP, Казахстан). *B. cereus*, *B. thuringiensis* и *B. subtilis* получены в виде вегетативных клеток, *B. clausii* и 55-ВНИИВВиМ – в виде спор. Все штаммы высевались на чашки со стерильной агаризованной средой LB без антибиотиков в боксе биобезопасности (класс II). Чашки культивировали при 37 °С 16 часов. Образцы ДНК *B. anthracis* получены из «Национального центра биотехнологии» (РГП «НЦБ») [8]. Все образцы ДНК, использованные в исследовании, предварительно протестированы путем амплификации фрагмента 16S рДНК

(универсальные праймеры 784F и 926R [9]) для подтверждения наличия бактериальной ДНК.

Выделение препаратов бактериальной ДНК проводили стандартно методом фенол-хлороформной экстракции согласно [10]. Определение количества нуклеиновых кислот проводили измерением ультрафиолетового поглощения на спектрофотометре NanoDrope (Thermo) при длине волны 260 нм.

Праймеры и флуоресцентные зонды синтезировали в лаборатории органического синтеза РГП «НЦБ». Праймеры и зонды для определения гена *lambdaBA_5361* имели следующую последовательность: GCCAAATTCAGCATCTTGGATG (Fw), TTTGTCCTGAACCTGTAATGCCT (Rv), Cy5-CGCAACATTCCTTGGTTTACCTG-BHQ3.

Праймеры и зонд для определения гена *lambdaBA_5358* имели следующую последовательность: GAAAATTCCTACAGCTCGTTTCGTG (Fw), AGCAAATGAACACGATTGTCGTCT (Rv), Cy5-AGGAAAATGCTGATGGCTCAGTCG-BHQ3.

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на приборах QuantStudio 5 и QuantStudio 6 Pro (Applied Biosciences) в следующем режиме: 1) 95 °С, 7 мин – 1 цикл; 2) 95 °С, 10 с; 59 °С, 30 с (сбор данных); 72 °С, 10 с – 40 циклов. Для ПЦР-РВ использовали HotStart-Taq-полимеразу («СибЭнзим») со стандартным HS-Taq-буфером («СибЭнзим»), дополнительно включающим 0,15 мг BSA (Thermo), 0,5 мМ дНТФ («СибЭнзим»), 2 мМ MgCl₂ («СибЭнзим»). Праймеры и зонды TaqMan добавляли в концентрации 400 нМ и 100 нМ соответственно. В качестве матрицы в реакции использовали от 1 фг до 1 нг total ДНК бактерий.

Результаты и обсуждение

Анализ хромосомы *B. anthracis* показал, что гены лямбдоидных профагов Ba01-Ba04 являются наиболее видоспецифичными. Для анализа использовали последовательность генома вакцинного штамма *B. anthracis* Ames (AE016879.1). В качестве генов-мишеней выбраны два гена профага *lambda-Ba03*: главный капсидный белок BA_5361 (AE016879.1: 4855298..4856278) и портовый белок фага BA_5358 (AE016879.1: 4852332..4853642). Следует отметить, что ген *lambdaBA_5358* более известен как PL3 [7] и рекомендован в качестве специфической мишени с 2011 г., но в данном исследовании нами выбрана 5'-концевая часть последовательности данного гена.

BLAST-анализ (ncbi.nlm.nih.gov) показал, что последовательности генов *lambdaBA_5361* и *lambdaBA_5358* не имеют гомологий среди других представителей семейства бацилл, даже при расширении границ поиска с megablast (высокогомо-

гичные последовательности) до blastn (сколько-то схожие последовательности). Последовательности праймеров и зондов TaqMan подобраны в программе Vector NTI Suite 11.0. Длина ПЦР продуктов составляла 134 н. для *lambdaBA_5361* и 132 н. для *lambdaBA_5358*. Оба зонда TaqMan мечены флуоресцентным красителем Cy5, чтобы иметь возможность включать их в реакцию одновременно, не используя лишний канал для детекции хромосомных генов.

Для определения чувствительности разработанных наборов праймеров и зондов проведена ПЦР-РВ с положительными контрольными образцами ДНК изолятов *B. anthracis* [8]. Также использовалась ДНК, выделенная из вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ. Реакцию проводили как ПЦР-РВ на множественные мишени, так и на одиночные мишени для сравнения эффективности. Выяснено, что множественный вариант ПЦР-РВ на оба гена показывает большую эффективность, чем при постановке реакций на одиночные мишени. Дальнейшее исследование проводилось только с использованием ПЦР-РВ на обе мишени.

На следующем этапе мы определили чувствительность разработанной системы на множественные мишени на ряде разведений контрольных ДНК *B. anthracis*. Анализ данных проводился в программе Q-Gene. Определенная нами чувствительность разработанного набора праймеров/зондов составила 100 фг тотальной бактериальной ДНК. В пересчете на количество геномов, исходя из размера генома *B. anthracis* $5,504 \cdot 10^6$ н., предел чувствительности составил 16,72 генома. Таким образом, мы показали, что линейный динамический диапазон, при котором коэффициент аппроксимации R^2 равен 0,99, имел протяженность от 16,72 до 167200,00 копий генома на реакцию. Эффективность реакции ПЦР РВ колебалась от 84 до 116 % (угол наклона = -3,77).

Для определения специфичности разработанного набора поставлена ПЦР-РВ с образцами ДНК *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. clausii*. В качестве положительного контроля использовали ДНК вакцинного штамма. Реакцию ставили в пяти повторях; специфичность набора составила 100 %, поскольку ни в одном образце помимо положительного контроля не детектировался сигнал флуоресценции. Стоит отметить, что в качестве контрольных образцов для проверки специфичности использовались в числе прочих *B. cereus* и *B. thuringiensis*, которые обеспечивают подавляющую долю кросс-реактивности при определении тест-системами, основанными на детекции плазмид pXO1 и pXO2 [4, 6].

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

Благодарность. Авторы выражают благодарность Александру Шевцову («Национальный центр

биотехнологии», Астана, Казахстан) за предоставленные образцы ДНК *B. anthracis*.

Финансирование. Проведенное исследование осуществлялось в рамках программы BR10764975 Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан.

References / Список литературы

1. Koehler T.M., Dai Z., Kaufman-Yarbray M. Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO2 and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. *J. Bacteriol.* 1994; 3:586–95. DOI: 10.1128/jb.176.3.586-595.1994.
2. Goel A.K. Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance. *World J. Clin. Cases.* 2015; 1:20–33. DOI: 10.12998/wjcc.v3.i1.20.
3. Ezzell J.W., Welkos S.L. The capsule of *Bacillus anthracis*, a review. *J. Appl. Microbiol.* 1999; 2:250–67. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00881.x.
4. Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolstø A.B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 6:2627–30. DOI: 10.1128/AEM.66.6.2627-2630.2000.
5. Pannucci J., Okinaka R.T., Sabin R., Kuske C.R. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J. Bacteriol.* 2002; 1:134–41. DOI: 10.1128/JB.184.1.134-141.2002.
6. Van der Auwera G.A., Andrup L., Mahillon J. Conjugative plasmid pAW63 brings new insights into the genesis of the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO2 and of the *Bacillus thuringiensis* plasmid pBT9727. *BMC Genomics.* 2005; 6:103. DOI: 10.1186/1471-2164-6-103.
7. Agren J., Hamidjaja R.A., Hansen T., Ruuls R., Thierry S., Vigre H., Janse I., Sundström A., Segerman B., Koene M., Löfström C., Van Rotterdam B., Derzelle S. *In silico* and *in vitro* evaluation of PCR based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences. *Virulence.* 2013; 8:671–85. DOI: 10.4161/viru.26288.
8. Shevtsov A., Lukhnova L., Izbanova U., Vernadet J.-P., Kuibagarov M., Amirgazin A., Ramankulov Y., Vergnaud G. *Bacillus anthracis* phylogeography: new clues from Kazakhstan, Central Asia. *Front. Microbiol.* 2021; 12:778225. DOI: 10.3389/fmicb.2021.778225.
9. Nossa C.W., Oberdorf W.E., Yang L., Aas J.A., Paster B.J., Desantis T.Z., Brodie E.L., Malamud D., Poles M.A., Pei Z. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16(33):4135–44. DOI: 10.3748/wjg.v16.i33.4135.
10. McKiernan H.E., Danielson P.B. Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. In: Patrinos G.P., editor. *Molecular Diagnostics* (3d edition). Academic Press; 2017. P. 371–94. DOI: 10.1016/B978-0-12-802971-8.00021-3.

Authors:

Nizkorodova A.S., S.A., Zhigailov A.V., Abdolla N. Institute of Molecular Biology and Biochemistry named after M.A. Aitkhozhin; Almaty, 050012, Republic of Kazakhstan. Almaty Branch of the National Center for Biotechnology; Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan.

Mal'seva E.R., Berdygulova Zh.A., Naizabaeva D.A., Kuatbekova Mashzhan A.S., Akhmetollaev I.A., Skiba Yu.A., Mamadaliev S.M. Almaty Branch of the National Center for Biotechnology. Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan.

Об авторах:

Низкородова А.С., Жигайлов А.В., Абдолла Н. РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина»; Республика Казахстан, 050012, Алма-Ата. Филиал РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии»; Республика Казахстан, 050054, Алма-Ата.

Мальцева Э.Р., Бердыгулова Ж.А., Найзабаева Д.А., Куатбекова С.А., Машижан А.С., Ахметоллаев И.А., Скиба Ю.А., Мамадалиев С.М. Филиал РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии». Республика Казахстан, 050054, Алма-Ата.

**О Международном симпозиуме “Yersinia 14”
и XVI Межгосударственной научно-практической конференции
по вопросам санитарной охраны территории и снижения риска распространения чумы**

26–28 сентября 2022 г. в Санкт-Петербурге под патронатом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека проведены Международный симпозиум “Yersinia 14” и XVI Межгосударственная научно-практическая конференция по вопросам санитарной охраны территории и снижения риска распространения чумы.

Международный симпозиум по иерсиниям проходил в Российской Федерации впервые в истории этого научного форума. Его проведение совпало с важными датами: 100-летием государственной санитарно-эпидемиологической службы и 125-летием системы противочумных учреждений России, уникальных организаций, обеспечивающих санитарно-эпидемиологическое благополучие по чуме и другим особо опасным инфекционным болезням.

В очном и заочном формате в мероприятиях приняли участие 250 человек из Российской Федерации и стран ближнего (Республика Азербайджан, Республика Армения, Республика Беларусь, Республика Казахстан, Киргизская Республика, Республика Таджикистан, Республика Узбекистан) и дальнего (Монголия, Социалистическая Республика Вьетнам, Гвинейская Республика, Демократическая Республика Конго, Бразилия, Венесуэла, Мадагаскар, Иран, Замбия, Бурунди, Китайская Народная Республика, США) зарубежья, а также представители Исполнительного комитета СНГ и Всемирной организации здравоохранения.

На открытии симпозиума и конференции выступали руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека А.Ю. Попова, которая представила приветствие председателя Правительства Российской Федерации В.М. Мишустина, и ис-

полняющий обязанности губернатора Санкт-Петербурга Н.В. Линченко. В формате видеобращения выступил региональный директор ВОЗ Hans Henri P. Kluge.

В докладах, представленных на симпозиуме “Yersinia 14” и XVI Межгосударственной конференции, а также в опубликованных материалах освещен широкий круг вопросов, касающихся эпидемиологии, профилактики и диагностики чумы и других опасных инфекционных болезней. Обсуждены проблемы эволюции и геномики чумного микроба, филогенетических особенностей штаммов, выделенных в различных очагах. Докладчики представили последние достижения в области изучения экологии и свойств возбудителей, патогенеза и вакцинопрофилактики. Большое внимание уделено проблемам санитарной охраны территории и межгосударственному сотрудничеству в области борьбы с опасными инфекционными болезнями, внедрению современных информационных, диагностических, профилактических технологий, необходимых для оптимизации мероприятий по обеспечению эпидемиологического благополучия. Обсуждены вопросы функционирования и усовершенствования систем мониторинга и реагирования на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера в странах СНГ.

Участники симпозиума и конференции отметили высокий научный уровень и прекрасную организацию обоих мероприятий.

Научным комитетом Международного симпозиума принято решение о проведении очередного симпозиума Yersinia-XV в 2025 г. в Монголии. XVII Межгосударственная научно-практическая конференция пройдет в Российской Федерации в 2024 г.

**О проведении XVI заседания Координационного совета
по проблемам санитарной охраны территорий государств –
участников Содружества Независимых Государств
от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней**

26 сентября 2022 г. в рамках проведения XVI Межгосударственной научно-практической конференции по вопросам санитарной охраны территории и снижения риска распространения чумы состоялось XVI заседание Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств – участников Содружества Независимых Государств от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней.

В заседании приняли участие члены Координационного совета и их полномочные представители от Республики Азербайджан, Республики Армения, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Киргизской Республики, Российской Федерации, Республики Таджикистан, Республики Узбекистан, а также представитель Исполнительного комитета СНГ. Вел заседание председатель Координационного совета – директор ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» В.В. Кутырев.

Участники заседания выразили признательность Российской Федерации и отметили, что реализация программ содействия России странам-партнерам на пространстве Содружества по вопросам внедрения ММСП и обеспечения эпидемиологического благополучия по чуме является важной составляющей как в теоретической части повышения квалификации соответствующих специалистов, так и в отработке практических навыков при проведении тренировоч-

ных учений и экспедиций по вопросам борьбы с особо опасными инфекциями.

В ходе заседания обсужден ряд проблемных вопросов. В частности, отмечена недостаточная работа ответственных лиц ряда государств – участников СНГ по реализации Положения о порядке осуществления информационного обмена между государствами – участниками СНГ о чрезвычайных ситуациях в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения и по формированию Реестра специалистов организаций санитарно-эпидемиологического профиля государств – участников СНГ для совместной работы в зоне чрезвычайной ситуации санитарно-эпидемиологического характера.

Участники заседания одобрили План работы Координационного совета на 2023–2024 гг. и Дорожную карту по разработке и актуализации межгосударственных нормативных документов. Все рассмотренные вопросы и принятые по ним решения отражены в протоколе заседания.

За активную деятельность по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств – участников СНГ, а также за продолжительную и безупречную работу в органах Совета по сотрудничеству в области здравоохранения СНГ председателю Координационного совета, директору института «Микроб» Владимиру Викторовичу Кутыреву вручена грамота Исполнительного комитета СНГ.