

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

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

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

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

Выпуск 4

2023

САРАТОВ

**Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 29448**
Стоимость подписки – от 1190,70 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

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

Проблемы особо опасных инфекций.
2023. Вып. 4. 162 с.

Подписано в печать 12.12.2023
Формат 60×84 1/8
Бумага мелованная
Печать офсетная
Усл. печ. л. 18,8
Заказ № 5626-23

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, 2023

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 (Оболенск, 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 (Оболенск, 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

2023, Issue 4

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

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

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

Editorial Council

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

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

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

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

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

- Ботвинкин А.Д., Зарва И.Д., Чупин С.А., Мельников А.В., Мельцов И.В. Чукотка как портал для распространения бешенства на Камчатку (систематический обзор) 6
- Липницкий А.В., Половец Н.В., Муругова А.А., Топорков А.В. Анализ и прогноз распространения в мире особо опасных микозов 16
- Стовба Л.Ф., Чухраля О.В., Павельев Д.И., Черникова Н.К., Борисевич С.В. Сравнение эффективности различных схем применения рекомбинантных векторных вакцин против лихорадки Эбола на основе вируса вакцины, штамм MVA ... 24
- Юдин М.А., Богачёва А.С., Бузмакова А.Л., Потапова А.В., Романова А.В., Калякина Д.О., Шилов В.В. Исторические аспекты биотерроризма. Факторы, определяющие возможность использования патогенных биологических агентов в качестве биологического оружия 32

Оригинальные статьи

- Анисимова Е.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Панкова Е.В., Осянин К.А. Применение HRM-анализа кривых плавления, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл 42
- Бердиев С.К., Ерошенко Г.А., Балыкова А.Н., Усенбаев Н.Т., Кебекбаева Н.Т., Джaparova A.K., Муканметесен уулу Ж., Жумашов Д., Разжапбаева А.Ш., Юлдашева А.М., Оглодин Е.Г., Катyshev A.D., Кузнецов А.А., Фадеева А.В., Кутырев В.В. Современные диагностические технологии в исследовании полевого материала 2023 г. из природных очагов чумы Кыргызской Республики 50
- Бренёва Н.В., Киселева Е.Ю., Шаракшанов М.Б., Борисов С.А., Будаева С.Е., Балахонов С.В. Современные особенности изоляции и идентификации патогенных лептоспир в Сибири и на Дальнем Востоке 62
- Горюнова П.А., Ерошенко Г.А., Балыкова А.Н., Коврижников А.В., Шевченко К.С., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Червякова Н.С., Кутырев В.В. MLVA25- и CRISPR-генотипы штаммов *Yersinia pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы 68
- Ильичева Т.Н., Моисеева А.А., Иванова К.И., Азаев М.Ш., Марченко В.Ю. Серомониторинг маркеров вирусов гриппа с пандемическим потенциалом в Российской Федерации в 2021–2023 гг. 77
- Le Thi Lan Anh, Ta Thi Loan, Dinh Thu Minh, Vu Thi Thuong, Pham Thi Ha Giang, Bui Thi Thanh Nga, Pham Viet Hung, Nguyen Ngoc Tan, Trieu Phi Long, Le Thi Van Anh, Hoang Dang Hieu. Профили антибиотикорезистентности у шига-токсин-продуцирующей *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella*, *Shigella* и *Staphylococcus aureus*, выделенных на двух общественных кухнях, расположенных в городе Ханой, Вьетнам 84
- Лучинин Д.Н., Устинов Д.В., Шпак И.М., Молчанова Е.В. Полногеномное секвенирование и поиск детерминант формирования устойчивости к действию бензалкония хлорида у *Burkholderia pseudomallei* 91

Reviews

- Botvinkin A.D., Zarva I.D., Chupin S.A., Mel'nikov A.V., Mel'tsov I.V. Chukotka as a Portal for the Rabies Introduction into Kamchatka (Systematic Review) 6
- Lipnitsky A.V., Polovets N.V., Murugova A.A., Toporkov A.V. Analysis and Forecast of the Spread of Particularly Dangerous Mycoses around the World 16
- Stovba L.F., Chukhraya O.V., Pavel'ev D.I., Chernikova N.K., Borisevich S.V. Comparison of the Efficacy of Different Schemes for Using Recombinant Vector Vaccines against Ebola Fever, Based on Vaccinia Virus, MVA Strain 24
- Yudin M.A., Bogacheva A.S., Buzmakova A.L., Potapova A.V., Romanova A.V., Kalyakina D.O., Shilov V.V. Historical Aspects of Bioterrorism: Factors Determining the Possibility of Using Pathogenic Biological Agents as Biological Weapons 32

Original articles

- Anisimova E.A., Mirgazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Pankova E.V., Osyanin K.A. Use of HRM-Analysis of the Melting Curves Obtained after Amplification of VNTR-Loci for Identification and Differentiation of *Brucella* Strains 42
- Berdiev S.K., Eroshenko G.A., Balykova A.N., Usenbaev N.T., Kebekbaeva N.T., Dzhaparova A.K., Mukanmetesen uulu Zh., Zhumashov D., Razhapaeva A.Sh., Yuldasheva A.M., Oglochin E.G., Katyshev A.D., Kuznetsov A.A., Fadeeva A.V., Kutyrev V.V. Modern Diagnostic Technologies in the Study of the Field Material Collected from the Natural Plague Foci of the Kyrgyz Republic in 2023 50
- Breneva N.V., Kiseleva E.Yu., Sharakshanov M.B., Borisov S.A., Budaeva S.E., Balakhonov S.V. Modern Features of Pathogenic *Leptospira* Isolation and Identification in Siberia and the Far East 62
- Goryunova P.A., Eroshenko G.A., Balykova A.N., Kovrizhnikov A.V., Shevchenko K.S., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Chervyakova N.S., Kutyrev V.V. MLVA25 and CRISPR Genotypes of *Yersinia pestis* Strains from the Caspian Sandy Plague Focus 68
- Ilyicheva T.N., Moiseeva A.A., Ivanova K.I., Azaev M.Sh., Marchenko V.Yu. Serological Monitoring of Pandemic Influenza Virus Markers in the Russian Federation in 2021–2023 77
- Le Thi Lan Anh, Ta Thi Loan, Dinh Thu Minh, Vu Thi Thuong, Pham Thi Ha Giang, Bui Thi Thanh Nga, Pham Viet Hung, Nguyen Ngoc Tan, Trieu Phi Long, Le Thi Van Anh, Hoang Dang Hieu. Antibiotic Resistance Patterns in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella*, *Shigella* and *Staphylococcus aureus* Isolated at Two Communal Kitchens Located in Hanoi City, Vietnam 84
- Luchinin D.N., Ustinov D.V., Shpak I.M., Molchanova E.V. Whole-Genome Sequencing and Search for Determinants of Resistance to Benzalkonium Chloride in *Burkholderia pseudomallei* 91

Макашова М.А., Куклева Л.М., Червякова Н.С., Нарышкина Е.А., Коврижников А.В., Ерошенко Г.А., Швиденко И.Г., Кутырев В.В. Ауксотрофность штаммов <i>Yersinia pestis</i> античного биовара и ее генетические основы	96	Makashova M.A., Kukleva L.M., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Kovrizhnikov A.V., Eroshenko G.A., Shvidenko I.G., Kutyrev V.V. Auxotrophy of <i>Yersinia pestis</i> Strains of Antiqua Biovar and Its Genetic Basis	96
Мельникова О.В., Быкова Н.А., Устинова Н.В., Андаев Е.И. Социально-демографические и эколого-эпидемиологические параметры заболеваемости клещевыми инфекциями в Прибайкалье	106	Mel'nikova O.V., Bykova N.A., Ustinova N.V., Andaev E.I. Socio-Demographic and Eco-Epidemiological Parameters of Tick-Borne Infections Morbidity in Baikal Region	106
Найденова Е.В., Захаров К.С., Карташов М.Ю., Агафонов Д.А., Сеничкина А.М., Катышев А.Д., Diallo M.A., Bah M.B., Boumbaly S., Кутырев В.В. Выявление генетических маркеров возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней в пробах иксодовых клещей, собранных на территории Гвинейской Республики	115	Naidenova E.V., Zakharov K.S., Kartashov M.Yu., Agafonov D.A., Senichkina A.M., Katyshev A.D., Diallo M.A., Bah M.B., Boumbaly S., Kutyrev V.V. Genetic Marker Detection of Natural-Focal Infectious Disease Pathogens in Samples of Ixodidae Ticks, Collected on the Territory of the Republic of Guinea	115
Осина Н.А., Булгакова Е.Г., Осин А.В., Швиденко И.Г., Щербак С.А. Вариативность генов <i>omp25</i> и <i>omp2a</i> у штаммов бруцелл различного таксономического положения	125	Osina N.A., Boolgakova E.G., Osin A.V., Shvidenko I.G., Shcherbakova S.A. Variability of <i>omp25</i> and <i>omp2a</i> Genes in <i>Brucella</i> Strains of Different Taxonomic Position	125
Танитовский В.А., Габбасов А.А., Суров В.В., Мек-Меченко В.Г., Саякова З.З., Майканов Н.С. Численность и видовой состав грызунов и насекомых в населенных пунктах Западно-Казахстанской области, расположенных на энзоотичной по чуме территории	135	Tanitovsky V.A., Gabbasov A.A., Surov V.V., Meka-Mechenko V.G., Sayakova Z.Z., Maikanov N.S. Population and Species Composition of Rodents and Insectivores in Settlements of the West Kazakhstan Region Located in the Plague Enzoitic Territory	135
Топорков В.П. Пандемия COVID-19: продолжительность и эпидемиологический прогноз	141	Toporkov V.P. COVID-19 Pandemic: Duration and Epidemiological Forecast	141
Шаров Д.А., Дармов И.В., Косенков И.В., Лещенко А.А., Багин С.В., Мохов Д.А., Лазыкин А.Г., Коваленко Е.А. Оценка возможности использования одноразовых полимерных контейнеров в технологии производства вакцины чумной живой	149	Sharov D.A., Darmov I.V., Kosenkov I.V., Leshchenko A.A., Bagin S.V., Mokhov D.A., Lazykin A.G., Kovalenko E.A. Possibility of Using Disposable Polymeric Containers in the Production Technology of Live Plague Vaccine	149
Краткие сообщения		Brief communications	
Прищепа Н.П., Добровольская Н.Ю., Никифорова В.И., Тарасова Т.С., Преображенская Е.В. Выявление мутаций гена <i>S</i> SARS-CoV-2 методом ПЦР в сезоны повышенной заболеваемости коронавирусной инфекцией в Чувашской Республике	156	Prishchepa N.P., Dobrovol'skaya N.Yu., Nikiforova V.I., Tarasova T.S., Preobrazhenskaya E.V. Detection of SARS-CoV-2 <i>S</i> Gene Mutations Using PCR during Seasons of Increased Incidence of Coronavirus Infection in the Chuvash Republic	156
Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Синельник Е.А., Иванова И.А., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А., Погожова М.П., Аноприенко А.О., Пасюкова Н.И. Оценка безопасности смеси холерных бактериофагов на модели экспериментальных животных	160	Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Sinel'nik E.A., Ivanova I.A., Filippenko A.V., Omel'chenko N.D., Trufanova A.A., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O., Pasyukova N.I. Assessment of Cholera Bacteriophages Mixture Safety on an Experimental Animal Model	160

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-6-15

УДК 616.98:578.824.11(571.651)

А.Д. Ботвинкин¹, И.Д. Зарва¹, С.А. Чупин², А.В. Мельников¹, И.В. Мельцов³**Чукотка как портал для распространения бешенства на Камчатку (систематический обзор)**¹ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет», Иркутск, Российская Федерация;²ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», Владимир, Российская Федерация;³ФГБОУ ВО «Иркутский государственный аграрный университет имени А.А. Ежевского», Иркутск, Российская Федерация

Цель обзора – оценить особенности распространения и эпидемиологическую опасность бешенства на крайнем северо-востоке Азии. Систематический обзор подготовлен в результате синтеза публикаций о бешенстве и «диковании» за 1860–2022 гг. ($n=22$) и ранее не опубликованных данных за 2009–2023 гг. С конца XIX в. до 1980-х гг. эпизоотии бешенства систематически наблюдались на Чукотке и Камчатке. Выявлена корреляционная связь времени возникновения заболеваний бешенством на этих территориях с лагом в 1–2 года ($r=0,349$; $p=0,054$). На Чукотке с 2009 по 2023 г. подтверждено 24 случая бешенства у животных; на Камчатке бешенство не регистрируется после 1981 г. До 1982 г. описано 5 подтвержденных случаев заболевания бешенством у людей на Чукотке, а также 4 случая смерти людей предположительно от бешенства (Чукотка – 3, Камчатка – 1). Установлено сходство пространственного распространения эпизоотий в разные периоды времени. Бешенство выявлялось преимущественно на территории постоянного обитания песца (*Vulpes lagopus*) в прибрежных тундрах от устья Колымы до Анадырского залива. За пределами этой территории (долины рек Анадырь и Пенжина, полуостров Камчатка) бешенство распространялось среди лисиц (*Vulpes vulpes*). В настоящее время значение песца в распространении бешенства на Чукотке сократилось, а значение лисицы существенно возросло. Благодаря вакцинации бешенство среди собак регистрируется sporadически. Изоляты вируса бешенства с Чукотки принадлежат к генетической линии Arctic (группа Arctic-3), имеющей циркумполярное распространение. Возможность независимой циркуляции вируса бешенства на Камчатском полуострове сомнительна из-за ограниченных размеров популяции лисицы. На основе картографирования установлены возможные направления заноса бешенства с Чукотки на Камчатский полуостров. Проведение барьерной оральной вакцинации лисиц рекомендуется в годы подъема численности лисицы и песца на Чукотке.

Ключевые слова: арктическое бешенство, Чукотка, Камчатка, история изучения, пространственно-временной анализ.

Корреспондирующий автор: Ботвинкин Александр Дмитриевич, e-mail: botvinkin_ismu@mail.ru.

Для цитирования: Ботвинкин А.Д., Зарва И.Д., Чупин С.А., Мельников А.В., Мельцов И.В. Чукотка как портал для распространения бешенства на Камчатку (систематический обзор). Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 4:6–15. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-6-15

Поступила 28.06.2023. Принята к публ. 04.07.2023.

A.D. Botvinkin¹, I.D. Zarva¹, S.A. Chupin², A.V. Mel'nikov¹, I.V. Mel'tsov³**Chukotka as a Portal for the Rabies Introduction into Kamchatka (Systematic Review)**¹Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation;²Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russian Federation;³Irkutsk State Agrarian University named after A.A. Ezhevsky, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The aim of this review was to assess the peculiarities of distribution and epidemiological risk of rabies in the extreme northeast of Asia. The systematic review was prepared through synthesizing publications on rabies over 1860–2022 ($n=22$) and previously unpublished data for 2009–2023. From the late 19th century until the 1980s, rabies epizootics were consistently observed in Chukotka and Kamchatka. A correlation was found between the time of occurrence of rabies in those territories with a lag period of 1–2 years ($r=0.349$; $p=0.054$). In 2009–2023, 24 animal rabies cases were confirmed in Chukotka; rabies has not been registered in Kamchatka since 1981. Until 1982, 5 confirmed human rabies cases were described in Chukotka, as well as 4 lethal cases presumably due to rabies (Chukotka – 3, Kamchatka – 1). The similarity of the spatial distribution of epizootics in different periods of time was established. Rabies was detected mainly in the area of the permanent polar fox (*Vulpes lagopus*) habitation, in the coastal tundra from the mouth of the Kolyma River to the Anadyr Gulf. Outside this territory (the valleys of the Anadyr and Penzhina Rivers, the Kamchatka Peninsula), rabies was reported in red foxes (*Vulpes vulpes*). At present, the importance of the polar fox in the spread of rabies in Chukotka has decreased, while the significance of the red fox has increased substantially. Due to vaccination, rabies among dogs is recorded sporadically. Rabies virus isolates from Chukotka belong to the Arctic genetic lineage (Arctic-3 group), which has a circumpolar distribution. The possibility of independent circulation of the rabies virus in the Kamchatka Peninsula is doubtful because of the limited size of the red fox population. Based on the mapping, possible directions for the introduction of rabies to Kamchatka from Chukotka have been identified. Barrier oral rabies vaccination of foxes is recommended during the years of high abundance of red and polar foxes in Chukotka.

Key words: Arctic rabies, Chukotka, Kamchatka, history of study, spatiotemporal analysis.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Acknowledgements: The authors are grateful to the specialists of the Veterinary Departments, Rospotrebnadzor Administrations and the Departments of Natural Resources and Ecology in the Chukotka Autonomous National District (Anadyr) and the Kamchatka Territory (Petropavlovsk-Kamchatsky) for their assistance in collecting information for 2009–2023.

Corresponding author: Aleksandr D. Botvinkin, e-mail: botvinkin_ismu@mail.ru.

Citation: Botvinkin A.D., Zarva I.D., Chupin S.A., Mel'nikov A.V., Mel'tsov I.V. Chukotka as a Portal for the Rabies Introduction into Kamchatka (Systematic Review). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:6–15. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-6-15

Received 28.06.2023. *Accepted* 04.07.2023.

Botvinkin A.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1324-7374>

Zarva I.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4225-5998>

Chupin S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2114-5589>

Mel'nikov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-1563-5400>

Mel'tsov I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8566-7004>

Бешенство широко распространено в арктических и субарктических районах Евразии и Северной Америки. В современной научной литературе при описании этой болезни на Крайнем Севере используются термины «арктическое бешенство» или Arctic rabies [1–3]. На Чукотке и Камчатке, а также на севере Сибири и на Аляске эта болезнь была известна с XIX в. под разными названиями: «дикование», «дикость», «дикуша», «камчатская дикость», Polar madness, Eskimo dog disease, Arctic dog disease и др. [4–8]. Необычное поведение и периодически возникающая массовая гибель песцов, лисиц, ездовых собак и северных оленей издавна привлекали внимание местного населения, первопроходцев и исследователей Севера [9, 10]. Ф. Холодцов, А.С. Грюнер и другие ветеринары, впервые наблюдавшие эту болезнь на северо-восточных окраинах России, полагали более 100 лет тому назад, что это бешенство, хотя отмечали особенности проявлений болезни и предлагали выделить ее в самостоятельную нозологическую форму [4, 11]. Главной особенностью в те времена считалась невосприимчивость человека к этой болезни [9–11].

В середине XX в. этиология болезни подтверждена выделением вируса бешенства от песцов *Vulpes (Alopex) lagopus* и других животных Арктики [7, 8, 12]. В дальнейшем основное внимание уделялось изучению природной очаговости и эпидемиологической значимости бешенства в высоких широтах. К настоящему времени заболевания людей бешенством зарегистрированы на северных территориях Российской Федерации от Чукотки до Кольского полуострова, на Аляске и в Гренландии [13–16]. В начале XXI в. установлено, что в Арктике и Субарктике циркулирует географический вариант вируса бешенства, получивший название «арктический», или arctic [2, 3]. Филогенетический анализ указывает на связь генетической линии вируса бешенства Arctic с родственной линией Arctic-like (подобная арктической), варианты которой в настоящее время распространены на юге Дальнего Востока России, в Китае, Индии, Непале и некоторых других районах Азии. Предполагается, что вирус бешенства проник на север Евразии и Америки из Юго-Восточной Азии с разделением генетических линий около 1500 лет назад [2]. Эти данные указывают на ключевую роль северо-востока Азии и Аляски в распространении бешенства в высоких широтах.

С 1982 г. Камчатский край считается благополучной по бешенству территорией. Сведения о бешенстве на Чукотке также отсутствовали в течение продолжительного времени, но после 2009 г. эпизоотологическая ситуация ухудшилась [16, 17]. Возникла угроза проникновения вируса бешенства на Камчатку через перешеек, соединяющий два полуострова. Для планирования превентивных мероприятий важно знать, как в прошлом распространялись эпизоотии в этом регионе. Из-за потепления климата и упадка пушного промысла ожидается изменение потенциала природных очагов бешенства в Арктике [3, 18, 19].

Разрозненные сведения о бешенстве на Чукотке и Камчатке опубликованы в виде тезисов, статей и отчетов в основном до 1990 г. и практически не представлены в современных электронных базах данных. Многие старые публикации становятся библиографической редкостью. На картах распространения бешенства в России информация по Камчатке и Чукотке отображена схематично [17, 20]. Актуальность проблемы определяется также растущей популярностью экологического туризма на Дальнем Востоке России. Таким образом, анализ накопленных сведений о бешенстве на рассматриваемой территории представляет научный и практический интерес.

Цель обзора – оценить особенности распространения и эпидемиологическую опасность бешенства на полуостровных территориях крайнего северо-востока Азии. Проведен систематический обзор публикаций о распространении бешенства на Камчатке и Чукотке за 1860–2022 гг. с включением ранее не опубликованных данных за 2009–2023 гг. Обработана информация о распространении бешенства в пределах современных границ Чукотского автономного округа (ЧАО) и Камчатского края. Принято во внимание, что до 1991 г. Чукотка и Камчатка входили в состав разных административных территорий Российской империи и СССР; в 1992 г. ЧАО выведен из состава Магаданской области, а в 2007 г. Корякский национальный округ включен в состав Камчатского края.

Поиски опубликованных источников проведены по каталогам библиотек, библиографическим указателям и спискам из статей и диссертаций, а также через интернет в электронных базах данных (ключевые слова: бешенство, арктическое бешенство,

дикование, Arctic rabies, Чукотка, Камчатка). В итоге отобрано 22 публикации, в которых имелись оригинальные сведения о бешенстве на двух соседних территориях [4–6, 9–11, 21–36].

Дополнительно использованы сведения, собранные региональными организациями ветеринарной и санитарно-эпидемиологической служб при осуществлении надзора за зоонозными инфекциями с 2009 г. до июня 2023 г. В анализ включены только лабораторно подтвержденные случаи бешенства ($n=24$). Сведения о численности и добыче лисицы за 2008–2023 гг. по данным зимних маршрутных учетов (ЗМУ) предоставлены департаментами природных ресурсов и экологии Камчатского края и ЧАО.

Собранные данные обработаны с использованием ГИС-технологий; статистические расчеты выполнены в программе Rstudio. Методические особенности описаны при изложении результатов по разделам.

Многолетняя динамика заболеваемости бешенством. По динамическим рядам данных визуально определяются многолетние периоды неблагополучия по бешенству и периоды, в течение которых сведения о бешенстве отсутствуют (рис. 1).

Из-за скудности количественных данных в опубликованных источниках для статистического анализа использовали бинарное кодирование. Годы с наличием информации о бешенстве отмечены как «1», другие годы – как «0» с последующим расчетом коэффициента корреляции Пирсона и кросс-корреляции по Камчатке и Чукотке за два периода: 1880–1982 гг. и 1950–1982 гг. За вековой период корреляция слабая ($r=0,197$; $p=0,048$), что, очевидно, связано с неточностями в регистрации бешенства в прошлом. Кросс-корреляционный анализ выявил статистически значимую связь с лагом $\pm(1-2)$ года и слабые признаки цикличности (рис. 1). Во второй половине XX в. корреляционная связь средней силы ($r=0,349$; $p=0,054$).

Статистические выкладки дополнены информацией из первоисточников в хронологии. Наиболее

ранние описания эпизоотий найдены в публикациях о быте и условиях жизни местного населения. И.А. Землянский приводит цитату из документов Российского государственного исторического архива Дальнего Востока с описанием болезни с типичными для бешенства проявлениями, поразившей в 1860 г. собак, лошадей и крупный рогатый скот на западном берегу Камчатки [35]. Известный исследователь Камчатки Н.В. Слюнин сообщал о повальном заболевании лисиц и собак в 1883 г. с характерными для бешенства признаками болезни [10]. Сообщения о такой же болезни на Чукотском полуострове в материалах экспедиций, организованных Русским императорским географическим обществом, относятся к 1880–1895 гг. [9, цит. по: 24]. Высокопрофессиональные наблюдения по Камчатскому краю за 1879–1899 гг. приводит ветеринарный врач Ф. Холодцов [4].

В начале XX в. упоминания о бешенстве волков, собак и оленей на Чукотке изредка появлялись в статистических сводках ветеринарной службы Дальнего Востока России [21]. Описания массового падежа собак от болезни, которую местное население и власти считали бешенством, приводит в своих отчетах ветеринарный врач Охотско-Камчатского края А.С. Грюнер. По его мнению, гибель собак нередко была связана с бескормицей и чумой плотоядных, но в 1915 г. на северо-западе Камчатки болезнь определенно имела признаки бешенства, хотя и отличалась от него [11]. О массовой гибели лисиц зимой 1919/20 г. на Камчатке сообщал зоолог и путешественник Стен Бергман [цит. по: 5, 24]. Обобщая данные за 1914–1936 гг., ветеринарный врач К.Н. Шерстобоев, работавший в районе бухты Провидения на Чукотке, писал: «...от бухты Тикси до Берингова пролива, по побережью Берингова моря и на Камчатке... часто наблюдаются опустошительные эпизоотии лиссаподобного заболевания» [6].

Периодически возникавшие эпизоотии «дикования» описаны на крайнем северо-востоке Азии зоологами и охотоведами, изучавшими промысел песца и лисицы в сибирской Субарктике. Эти публикации

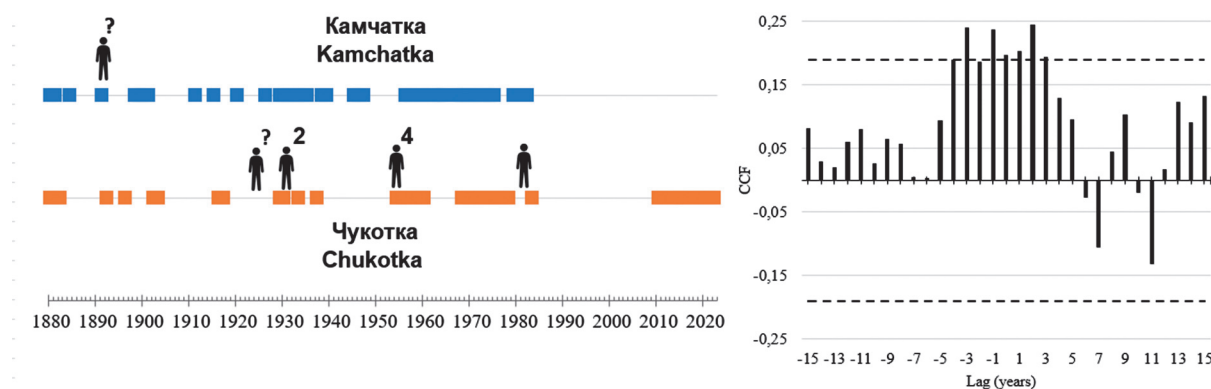


Рис. 1. Динамика выявления бешенства у людей и животных в 1880–2023 гг. и кросс-корреляция по годам данных по Чукотке и Камчатке в 1880–1982 гг.:

? – дата точно неизвестна; 2 и 4 – число случаев у людей; пунктир – 95 % доверительные интервалы

Fig. 1. Dynamics of human and animal rabies detection in 1880–2023 and cross-correlation function (CCF) of the data by years for Chukotka and Kamchatka in 1880–1982:

? – date is not precisely known; 2 and 4 – the number of human rabies cases; the dotted line – 95 % confidence intervals

основаны на собственных полевых наблюдениях и информации, полученной от охотников [22, 24, 25, 28–30]. Особенно интенсивные эпизоотии отмечены в 1953–1959 и 1969–1972 гг. В ряде случаев бешенство подтверждено лабораторными исследованиями [26–28]. Из публикаций второй половины XX в. следует, что заболевания животных бешенством систематически выявлялись на Чукотке и Камчатке до начала 1980-х гг. Так, массовая гибель песцов отмечена на Чукотке в долинах рек Песцовая и Неизвестная зимой 1977/78 г. [34]. В 1980–1982 гг. бешенство подтверждено у песцов на о. Врангеля [32] и в окрестностях г. Анадыря [33]. Последние единичные случаи бешенства у животных на Камчатке зарегистрированы в 1974, 1978 и 1981 гг. [36]. С 1991 по 2008 г. в официальных статистических документах сведения о бешенстве в ЧАО отсутствуют [16]. По данным ветеринарной службы, начиная с 2009 г. на Чукотке выявлялось от 1 до 8 лабораторно подтвержденных случаев бешенства в год, иногда с перерывами в 1–2 года. Больше всего случаев зарегистрировано в 2023 г.

ГИС-анализ пространственного распространения бешенства животных. В отобранных для анализа публикациях (n=22) Чукотка и Камчатка упоминались почти одинаково часто (14 и 12 соответственно), в том числе в четырех публикациях фигурируют обе территории. Картографирование собранных данных выполнено с помощью программы QGIS 3.2.1 на основе электронной ландшафтно-географической карты Natural Earth и открытых данных аэрокосмической съемки GoogleEarth. Локализация случаев на картах обозначена разными значками в зависимости от точности привязки к местности в первоисточнике (см. легенду к рис. 2).

Как следует из ранних публикаций, до 1950 г. падеж собак, лисиц и песцов от «дикування» наблюдался на Чукотке преимущественно вдоль морского побережья, а также в долине р. Анадырь [6, 9]. Аналогичные особенности прослеживаются по схематической карте распространения бешенства животных на Чукотке в 1967–1977 гг. [31]. В пределах территории бывшего Корякского национального округа бешенство с наибольшим постоянством отмечалось в долинах р. Пенжины и ее притоков, а в отдельные годы проникало до р. Гижиги (ныне территория Магаданской области) [25, 27]. В публикациях по Камчатскому краю чаще упоминаются западное побережье и северо-восточные территории вблизи перешейка, но в некоторые годы бешенство распространялось по всему полуострову вплоть до мыса Лопатка [25, 27, 28]. Последовательное продвижение эпизоотии бешенства с материка на Камчатку прослежено в статье эпидемиолога Т.А. Яковлевой и соавт.: в 1959–1961 гг. бешеных лисиц наблюдали в Пенжинском районе Камчатского края севернее перешейка; в 1961–1962 гг. заболевания животных выявлены в населенных пунктах вдоль западного побережья Камчатки (Тигильский район); в 1963 г. эпизоотия охватила южные и центральные райо-

ны; в 1964 г. не выявлено ни одного случая [27]. Обобщенная информация до 1982 г. представлена на карте. В современный период бешенство на Чукотке, как и в прошлом, регистрируется в приморских тундрах от устья р. Колымы до Анадырского залива и проникает вглубь материка по долине р. Анадырь (рис. 2).

Сведения о заболевании людей бешенством.

О том, что люди не заболевают бешенством после укусов бешеными животными в Арктике, упоминается в большинстве из 22 отобранных для анализа публикаций по Чукотке и Камчатке, но только в четырех из них (18,2 %) содержится конкретная информация, а не ссылки на работы предшественников. В качестве доказательств описаны нападения «дикующих» собак, волков и песцов на людей, которые не заболевали, несмотря на серьезные травмы головы и рук, хотя собаки, покусанные теми же животными, быстро погибали [4, 6, 10, 11]. В то же время в пяти публикациях (22,7 %) имеются сообщения о заболевании людей.

Так, А. Шмит сообщает о смерти матроса парохода «Колыма», зимовавшего во льдах между о. Врангеля и материком в 1928/29 г. «Найдя мертвого песца и содрав с него шкуру, матрос заболел бешенством и умер» [23, с. 16]. Этой же зимой артельщик с парохода «Ставрополь», стоявшего во льдах в бухте Провидения, был покусан в лицо и руки песцом, забежавшим на пароход. Пострадавший «...умер через некоторое время при наличии нервного расстройства». В статье приведено сообщение врача (без указания года) о заболевании «...эскимоса, имевшего в анамнезе укус больной собакой. Смерть наступила при нарастающих паралитических явлениях» [6, с. 102]. В 1914 г. бешеный волк забежал в стойбище оленеводов чаучу и покусал двух человек, которые «в ближайшие дни умерли от ран» [6, с. 101]. В статье Ф. Холодцова со слов местного приказчика из с. Толбачик записано, что «...камчатский житель был покусан бешеной собакой, отчего он заболел также бешенством и умер» [4, с. 117].

В 1953–1956 гг. в Анадыре впервые на Чукотке официально зарегистрировано четыре случая смерти людей от бешенства после укусов собак [31]. В 1982 г. после укусов в лицо, нанесенных песцом в окрестностях г. Анадыря, погибла от бешенства женщина, диагноз у которой подтвержден в лаборатории профессора М.А. Селимова [33]. В общей сложности обнаружены сведения об 11 случаях смерти людей, ассоциированных с укусами собак (5), песцов (3) и волка, из которых пять официально зарегистрированы как бешенство, четыре предположительно вызваны бешенством на основании проявлений болезни, и два человека, вероятно, погибли от ран. Большая часть этих случаев приходится на Чукотку, и только один описан на Камчатке (рис. 1).

Еще в середине прошлого века А.Н. Шерстобоев писал, что «имеются некоторые основания считать невосприимчивость людей не абсолютной» [6, с. 101]. Известно, что коренные жители Камчатки

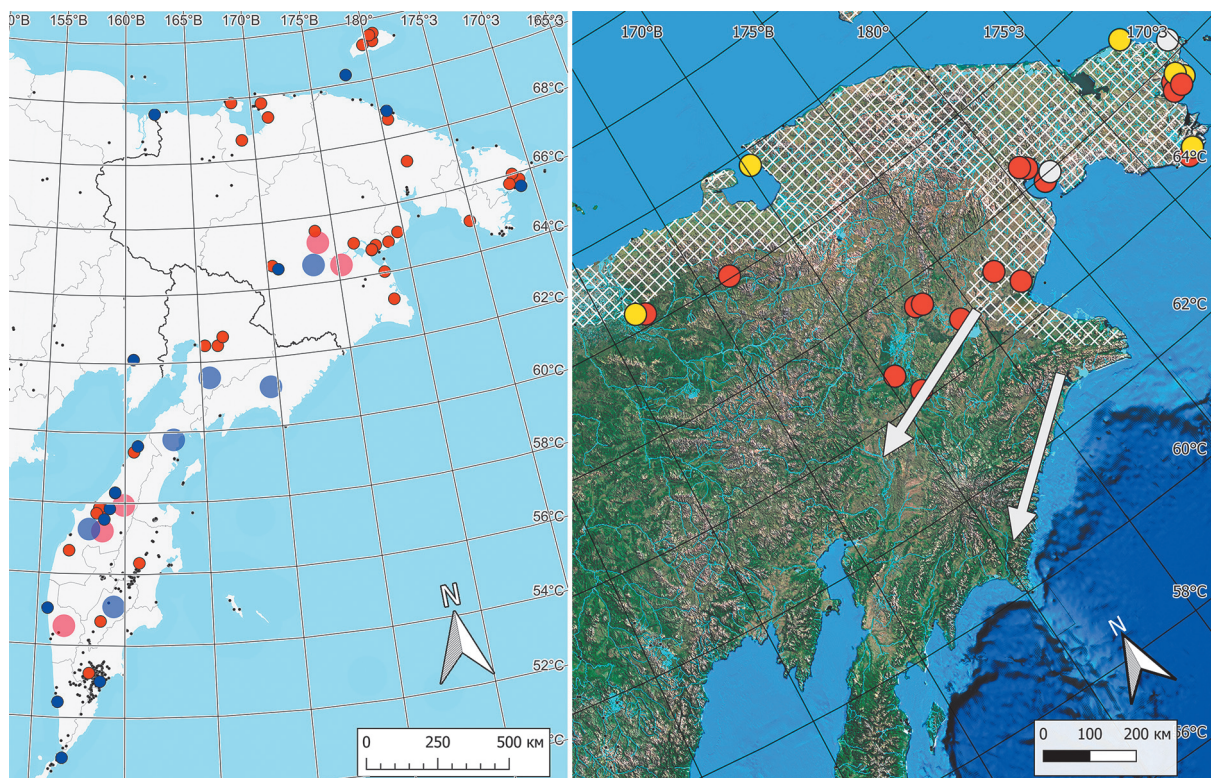


Рис. 2. Пространственное распространение бешенства животных на Камчатке и Чукотке, 1860–2023 гг.:

Карта слева: синие значки – 1860–1949 гг.; красные значки – 1950–1982 гг.; маленькие цветные значки – случаи бешенства с известными координатами; большие цветные значки – эпизоотии и вспышки с привязкой к району; маленькие черные точки – населенные пункты; черные линии – современные административные границы

Карта справа: случаи бешенства животных в 2009–2023 гг.; красные значки – лисица; желтые – собака; белые – песец; штриховка – территория постоянного обитания песца в конце XX в. [по 38]; стрелки – основные пути миграций песца в направлении Камчатки [по 34]

Fig. 2. Spatial distribution of animal rabies in Kamchatka and Chukotka, 1860–2023:

Map on the left: blue icons – 1860–1949; red icons – 1950–1982; small colored icons – rabies cases with known coordinates; large colored icons – epizootics and outbreaks with reference to the area; small black dots – settlements; black lines – modern administrative boundaries

Map on the right: animal rabies cases in 2009–2023; red icons – red fox; yellow ones – dogs; white – polar fox; hatching – the territory of the permanent habitation of the polar fox at the end of the 20th century [38]; arrows – the main routes of polar fox migration towards Kamchatka [34]

боялись «дикующих» животных и в XIX в. лечили нанесенные ими раны «самым радикальным средством»: «...укушенное место захватывали клещами, вырезали ножом... и прижигали каленым железом» [4, с. 117–118]. Во многих публикациях приводятся объяснения причин редкости заболеваний людей бешенством в высоких широтах, включая низкую численность населения, постоянное ношение теплой одежды, защищающей от укусов, особенности поведения местных собак, традиции уничтожения заболевших собак при самых первых признаках болезни и др. [4, 6, 10, 11, 13].

Идентификация вируса арктического бешенства. До середины прошлого века в публикациях преобладали сведения, основанные на характерных проявлениях болезни без лабораторного подтверждения. Первые экспериментальные доказательства связи эпизоотий среди собак на крайнем северо-востоке России с вирусом бешенства получены А.С. Шерстобоевым. Он установил, что антирабическая вакцина защищала собак, укушенных «дикующими» животными на Чукотке [6]. Эта работа и первые статьи о выделении вируса бешенства на о. Котельном (Новосибирские острова) и на Аляске

[7, 12] были опубликованы почти одновременно, но эксперименты по вакцинации проведены раньше. Долгое время важным аргументом в пользу существования особой формы болезни на севере считалось отсутствие телец Негри в головном мозге больных животных [11, 12]. Оказалось, что этот дифференциальный признак не универсален, в том числе тельца Негри обнаружены в пробах мозга животных, направленных с Камчатки в Москву [27]. Применение люминесцентной микроскопии для диагностики окончательно развеяло миф об отсутствии специфических для бешенства внутриклеточных включений в головном мозге «дикующих» животных [39].

Впервые надежно идентифицировать изоляты вируса бешенства арктического происхождения удалось с помощью моноклональных антител Р-41 в тесте непрямой иммунофлюоресценции [40]. Этот тест позволил подтвердить специфику штаммов, выделенных на севере Сибири, в том числе от песцов с о. Врангеля в 1980 г. [1]. В 1999 г. вирус бешенства с антигенным маркером арктических штаммов впервые выделен от человека, заразившегося в районе г. Норильска, и получены прямые доказательства опасности этого вируса для людей [41].

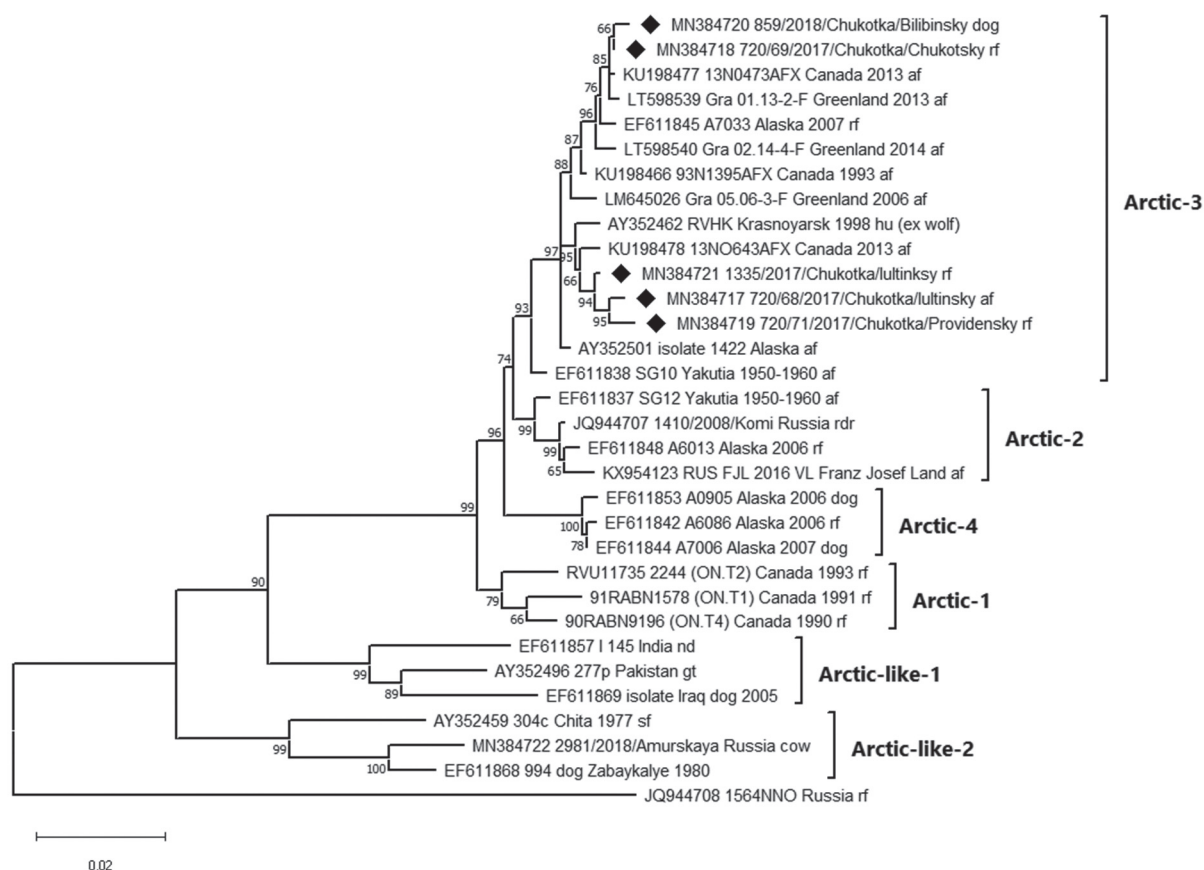


Рис. 3. Филогенетическое дерево изолятов вируса бешенства генетических линий Arctic и Arctic-like:

ромбы – изоляты с Чукотки; цифры в узлах дерева – показатели бутстреп-анализа (1000 повторений); для изолятов на дереве приведены номер в GenBank, название изолята, место, год и источник выявления (*rf* – лисица; *af* – песец; *rdr* – северный олень; *sf* – корсак; *dog* – собака; *cow* – крупный рогатый скот; *gt* – коза; *hu* – человек; *nd* – нет данных)

Fig. 3. Phylogenetic tree of rabies virus isolates of Arctic and Arctic-like genetic lineages:

rhombuses – isolates from Chukotka; the numbers in the nodes of the tree are indicators of bootstrap analysis (1000 repetitions); for isolates on the tree, the number in the GenBank, the designation of the isolate; site, year and source of detection are provided (*rf* – red fox; *af* – Arctic fox; *rdr* – reindeer; *sf* – corsac; *gt* – goat; *hu* – human; *nd* – no data)

Кардинальный прогресс в этом направлении достигнут на основе современных молекулярных технологий [2, 3]. Первые результаты секвенирования и филогенетического анализа фрагментов РНК изолятов вируса бешенства с Чукотки приведены в этой работе (рис. 3). Частичное секвенирование генома 5 изолятов вируса бешенства с Чукотки и филогенетический анализ проведен по методике, описанной ранее [37]. Дерево построено в программе MEGA11 с использованием метода *Maximum Likelihood* и модели *General Time Reversible* на основе анализа нуклеотидных последовательностей почти полноразмерного гена *N* (1350 п.н.) 32 изолятов вируса бешенства из различных регионов. В качестве внешней группы использован изолят от лисицы из средней полосы России (1564NNO), относящийся к генетической линии Steppe (Степная). Все изоляты вируса бешенства с Чукотки отнесены к группе Arctic-3, которая имеет циркумполярное распространение, включая север Якутии, Аляску, северо-западное побережье Канады и Гренландию [2, 3]. Старые изоляты вируса с Камчатки не сохранились.

Не исключено, что в прошлом могли иметь место завозы вируса бешенства на Крайний Север

из умеренных и южных широт с собаками – неизменными участниками северных экспедиций [42], но прямых доказательств этого на Чукотке и Камчатке не обнаружено.

Видовой состав хозяев вируса бешенства.

И местное население, и ветеринарные специалисты прошлого считали, что падеж собак возникает после того, как начинают «диковать» песцы и лисицы [4, 6, 10, 11]. В большинстве источников нет точных сведений о количестве заболевших животных, поэтому участие животных разных видов в распространении бешенства оценено по частоте их упоминания в опубликованных работах (таблица). В таблицу включены виды животных из числа основных хозяев вируса бешенства. Виды-«жертвы» (северный олень, крупный рогатый скот, лошади, свиньи), которые отмечены в пяти источниках по Чукотке и в четырех – по Камчатке, исключены из статистических расчетов.

Сведения о заболевании песцов на Камчатке отсутствуют. Но в публикациях по Чукотке о бешенстве этих животных в прошлом упоминалось чаще, чем о бешенстве лисиц. В последние годы на Чукотке бешенство чаще всего выявляли у лисиц (73,9 %) и лишь два случая (8,7 %) подтверждено

Оценка видового состава хозяев вируса бешенства на Чукотке и Камчатке в разные периоды времени
Assessment of the species composition of rabies virus hosts in Chukotka and Kamchatka in different periods of time

Виды животных / Species of animals	Количество случаев бешенства, 2009–2023 гг. Number of animal rabies cases, 2009–2023	Количество публикаций с указанием видов бешеных животных, 1860–1982 гг. Number of publications indicating the species of rabid animals, 1860–1982	
	Чукотка / Chukotka (n=24)*	Чукотка / Chukotka (n=13)**	Камчатка / Kamchatka (n=11)**
Песец / Arctic fox (<i>Vulpes lagopus</i>)	2	8	0
Лисица / Fox (<i>Vulpes vulpes</i>)	16	6	9
Волк / Wolf (<i>Canis lupus</i>)	0	3	2
Собака / Dog (<i>Canis familiaris</i>)	6	7	5
Статистическая оценка различий Statistical assessment of differences	$\chi^2=11,22$; $p=0,011$		$\chi^2=7,85$; $p=0,05$

Примечания: * лабораторно подтвержденные случаи; ** в некоторых публикациях одновременно указано несколько видов; заливкой выделено 1-е ранговое место.

Notes: * laboratory confirmed cases; ** in some publications, several species are indicated at the same time; 1st ranking position is marked by light-blue color.

у песцов. В этот же период, при расследовании обстоятельств заболевания четырех собак на Чукотке, в трех случаях установлены их контакты с лисицами. Статистический анализ подтверждает различия списков видов хищных млекопитающих, вовлекаемых в циркуляцию вируса бешенства на Камчатке и Чукотке в прошлом, а также на Чукотке в разные периоды времени.

Особенности биологии песца и лисицы. Оптимальные местообитания песца (*V. lagopus*) и лисицы (*V. vulpes*) не совпадают. Места размножения и постоянного обитания песца приурочены к сравнительно узкой полосе типичных арктических тундр на побережье Северного Ледовитого океана и Чукотском полуострове (рис. 2). Осенью и зимой для этого вида характерны дальние миграции преимущественно на восток и юг вдоль морского побережья и по долинам рек, а также на север и восток по льдам океана. Регулярные заходы песца на Камчатку и западное побережье Охотского моря отмечались до середины прошлого века. Известными направлениями миграций служат Анадыро-Пенжинская депрессия и побережье Берингова моря. В настоящее время масштабы кочевок сократились и миграционные пути не идут далее нижнего течения р. Пенжины и залива Корфа [25, 34, 38]. Область постоянного обитания песца в течение XX в. сокращалась. Ареал лисицы, напротив, расширился до Чаунской губы и устья р. Колымы. Этот вид предпочитает равнинные и холмистые ландшафты с чередованием лесных и луговых стадий, а также кустарниковые тундры, вытесняя из них песца [34]. Для обоих видов характерны значительные колебания численности без строгой цикличности; вспышки численности песца обычно наблюдались после массового размножения леммингов и сопровождались миграциями и эпизоотиями. В прошлом в годы «хорошего хода» и «набегов» лисицы и песца добывалось рекордное количество пушнины. После эпизоотий промысел резко сокращался, а весной охотники находили многочисленные трупы

животных в зимнем меху [29, 34, 36]. Так, например, до 1972 г. в Камчатском крае заготавливалось 1,3–4,5 тыс. шкурок лисицы ежегодно, а в 1973 г. после эпизоотии – всего 562 [28].

В современный период наблюдается тенденция снижения численности лисицы на Чукотке и, особенно, на Камчатке на фоне нерегулярных колебаний с промежутками в 3–5 лет (рис. 4). При визуальной оценке графиков после 2010 г. отмечаются признаки «зеркальности», но корреляция показателей численности лисицы по годам на этих территориях практически отсутствует ($r=-0,07$; $p=0,88$). Лисица считается обычным видом и нередко живет в близком соседстве с людьми. Причины снижения ее численности не вполне понятны. Охотничий пресс незначителен: на Камчатке охотники-любители добывают 370–780 лисиц в год, на Чукотке – всего 30–35. Промысел песца прекращен в силу экономических причин, а зимние учеты численности не проводятся из-за особенностей природных условий. Ориентировочно современная численность этого вида на Чукотке оценивается в 6 тыс. особей.

Профилактические мероприятия в современный период. В последнее десятилетие в ЧАО 4,7–4,8 тыс. собак и 1,1–1,4 тыс. кошек ежегодно прививалось вакциной «Щелково-51». С 2021 г. организованы отлов и вакцинация против бешенства животных без владельцев (до тысячи голов в год). Аналогичная работа постоянно проводится в Камчатском крае. В 2009–2023 гг. в ходе пассивного и активного мониторинга на Чукотке исследованы на бешенство пробы от 172 животных, в том числе 13,4 % с положительным результатом. С 2009 г. в очагах с подтвержденными случаями бешенства у животных были укушены 9 человек; все пострадавшие получили прививки от бешенства. Значительно чаще укусы наносили животные, у которых диагноз бешенства не установлен, – 205 случаев в год на Чукотке и 679 случаев на Камчатке (в среднем за 2013–2018 гг.). При этом показатели обращаемости населения за антирабической

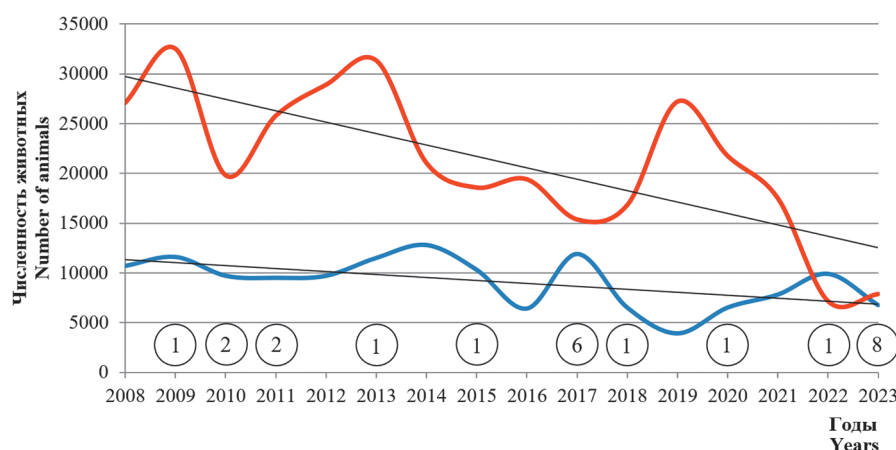


Рис. 4. Динамика численности лисы в Чукотском АО (синий график) и Камчатском крае (красный) в 2008–2023 гг. и подтвержденные случаи бешенства на Чукотке:

численность в I квартале текущего года по данным ЗМУ; в кругах – число случаев бешенства

Fig. 4. Dynamics of the red fox population in Chukotka Autonomous District (blue line) and Kamchatka Territory (red line) in 2008–2023 and confirmed rabies cases in Chukotka:

red fox numbers in the 1st quarter of the current year according to winter route census; in circles – the number of animal rabies cases

помощью в ЧАО примерно в два раза выше, чем в Камчатском крае (408,5 и 213,9 на 100 тыс. населения соответственно), процент назначения на прививки (82,3 и 61,8 % соответственно в 2013 г.) также выше [16]. Численность населения в Камчатском крае в 6 раз больше, чем в ЧАО.

Несмотря на отрывочный характер и возможные пробелы в сборе информации, очевидно, что с конца XIX в. до 1980-х гг. заболевания животных бешенством систематически, а в отдельные периоды одновременно, наблюдались на Чукотке и Камчатке. Заболевания бешенством на этих территориях связаны с лагом во времени в 1–2 года. В настоящее время эпизоотический процесс на территории ЧАО продолжается, в Камчатском крае бешенство не регистрируется уже более 40 лет.

Результаты анализа публикаций не согласуются с широко распространенным мнением о том, что бешенство («дикование») не представляет опасности для людей на Крайнем Севере. На Чукотке описано больше случаев заболевания людей бешенством, чем во всех других северных регионах России вместе взятых. Единственный и сомнительный (по мнению автора его описания) случай отмечен на Камчатке в конце XIX в. Тем не менее причины редкости заболевания заслуживают дальнейшего изучения.

Картографический анализ совокупности накопленных данных указывает на сходство пространственного распространения эпизоотий в разные периоды времени. В ЧАО бешенство выявлялось преимущественно на территории постоянного обитания песца – в прибрежных тундрах от устья Колымы до Анадырского залива. Повторяющиеся выносы вируса бешенства за пределы этой территории с распространением среди лис характерны для долины р. Анадырь. В Камчатском крае бешенство с наибольшим постоянством в прошлом выявлялось в бассейне р. Пежины, вдоль западного побережья Камчатского полуострова, а также в долинах рек Камчатка и Авача, где расположена основная часть населенных пунктов (рис. 2).

Бешенство в Арктике – типичная природно-очаговая инфекция. В настоящее время на крайнем северо-востоке Азии роль песца в распространении

бешенства снижается, а значение лисы существенно возросло. Благодаря вакцинации ушли в прошлое опустошительные эпизоотии среди собак, бешенство среди которых регистрируется спорадически.

Чукотка является частью трансконтинентальной эндемичной территории с постоянной циркуляцией вируса бешенства генетической линии Arctic. Циркумпольное распространение варианта Arctic-3 обеспечивается способностью песца совершать дальние миграции [34, 38, 43]. Возможность непрерывной циркуляции вируса бешенства на Камчатском полуострове сомнительна из-за ограниченных размеров популяции лисы, и природный очаг здесь имеет зависимый характер. Очевидно, в прошлом заносы периодически происходили с Чукотки, но прекратились в 1980-е гг. в результате сокращения масштабов миграций песца. Наиболее вероятным экологическим коридором распространения бешенства на Камчатку служила Анадыро-Пенжинская депрессия.

Несмотря на многолетнее благополучие, вероятность заноса бешенства на Камчатку сохраняется и будет возрастать при подъемах численности песца и лисы на Чукотке. Имеется возможность снижения риска заноса. В годы интенсивного размножения песца и лисы на Чукотке целесообразно комплексное использование мер по снижению численности и оральной вакцинации лис в Анадырском районе ЧАО, в Пенжинском районе Камчатского края и на перешейке, соединяющем материк с полуостровом. Для создания эффективного барьера необходим систематический мониторинг за популяциями леммингов, песца и лисы на Чукотке.

Заслуживает восхищения публикация Ф. Холодцова, который профессионально обосновал значение диких животных Арктики как резервуара бешенства задолго до разработки концепции природной очаговости болезней [4].

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Благодарность. Авторы признательны специалистам управлений ветеринарии, управлений Роспотребнадзора и департаментов природных ресурсов и экологии по Чукотскому автономному национальному округу (г. Анадырь) и Камчатского края (г. Петропавловск-Камчатский) за помощь в сборе информации за 2009–2023 гг.

Список литературы

1. Селимов М.А., Ботвинкин А.Д., Татаров А.Г. Идентификация штаммов сylvatic и арктического бешенства с помощью моноклональных антител. *Вопросы вирусологии*. 1983; 28(3):243–4.
2. Kuzmin I.V., Hughes G.J., Botvinkin A.D., Gribencha S.G., Rupprecht C.E. Arctic and Arctic-like rabies viruses: distribution, phylogeny and evolutionary history. *Epidemiol. Infect.* 2008; 136(4):509–19. DOI: 10.1017/S095026880700903X.
3. Nadin-Davis S.A., Falardeau E., Flynn A., Whitney H., Marshall H.D. Relationships between fox populations and rabies virus spread in northern Canada. *PLoS One*. 2021; 16(2):e0246508. DOI: 10.1371/journal.pone.0246508.
4. Холодцов Ф. Очерк скотоводства Камчатского полуострова. Часть II. В кн.: Сведения о ветеринарно-санитарном состоянии Приморской области. Кн. 4. Владивосток; 1913. С. 98–122.
5. Elton C. Epidemics among sledge dogs in the Canadian Arctic and their relation to disease in the arctic fox. *Can. J. Res.* 1931; 5(6):673–92. DOI: 10.1139/cjr31-106.
6. Шерстобоев К.Н. О камчатской дикости животных. *Труды Иркутской научно-исследовательской ветеринарной опытной станции*. 1949; 1:99–116.
7. Plummer P.J. Preliminary note on Arctic dog disease and its relationship to rabies. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 1947; 11(6):154–60.
8. Канторович Р.А. Этиология «дикування» животных в Заполярье. Сообщение I. Биологические свойства вируса «дикування». *Вопросы вирусологии*. 1956; 1(2):32–6.
9. Гондати Н.Л. Поездка из с. Марково на р. Анадырь, в бухту Провидения (Берингов пролив). В кн.: Записки Приамурского отдела Императорского Русского географического общества. Т. 4. Вып. 1. Хабаровск; 1898. С. 1–42.
10. Слюнин Н.В. Охотско-Камчатский край: естественно-историческое описание (с картой). СПб.: Издание Министерства финансов; 1900. Т. 1. С. 628–9.
11. Грюнер А.С. Текстовая часть отчета о ветеринарно-санитарном состоянии Камчатской области за 1915 г. *Архив ветеринарных наук*. 1916; 1:1384–429.
12. Туревич Е.И., Тебякина А.Е. Бешенство и так называемое «дикування» животных в Заполярье. *Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии*. 1947; 2:17–25.
13. Егоров И.Я., Марамович А.С., Ботвинкин А.Д., редакторы. Эпидемиологический надзор за особо опасными и природно-очаговыми инфекциями в условиях Крайнего Севера. Якутск; 2000. 341 с.
14. Lassen H.C. Paralytic human rabies in Greenland. *Lancet*. 1962; 1(7223):247–9. DOI: 10.1016/s0140-6736(62)91194-7.
15. Hueffer K., Murphy M. Rabies in Alaska, from the past to an uncertain future. *Int. J. Circumpolar Health*. 2018; 77(1):1475185. DOI: 10.1080/22423982.2018.1475185.
16. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Нашатырева Д.Н., Градобоева Е.А., Пакскина Н.Д., Попова И.В. Бешенство в Российской Федерации. Информационно-аналитический бюллетень. Омск: Полиграфический центр КАН; 2019. 110 с.
17. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н. Анализ особенностей эпизоотолого-эпидемической ситуации и риск заражения бешенством в Российской Федерации в начале XXI века. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 4:16–25. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-16-25.
18. Revich B., Tokarevich N., Parkinson A.J. Climate change and zoonotic infections in the Russian Arctic. *Int. J. Circumpolar Health*. 2012; 71:18792. DOI: 10.3402/ijch.v71i0.18792.
19. Simon A., Beauchamp G., Bélanger D., Bouchard C., Fehlner-Gardiner C., Lecomte N., Rees E., Leighton P.A. Ecology of Arctic rabies: 60 years of disease surveillance in the warming climate of northern Canada. *Zoonoses Public Health*. 2021; 68(6):601–8. DOI: 10.1111/zph.12848.
20. Ботвинкин А.Д., Сидоров Г.Н., Полещук Е.М., Зарва И.Д., Нашатырева Д.Н., Якович Н.В., Андаев Е.И., Балахонов С.В., Рудаков Н.В. Ретроспективная оценка реализации долгосрочного прогноза пространственного распространения бешенства в азиатской части России. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:13–21. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-13-21.
21. Обзор Приморской области за 1901 и 1902 год. Обзор Приморской области за 1902 год. Владивосток; 1905. С. 1–28.
22. Сокольников Н.П. Охотничьи и промысловые звери Анадырского края. *Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический*. 1927; 36(1-2):117–62.
23. Шмит Э. Бешенство в Колымском округе. *Охотник*. 1930; 9-10:15–16.
24. Формозов А.Н. Колебания численности промысловых животных. М.; Л.: Всесоюзное кооперативное объединенное изд-во; 1935. 108 с.
25. Бажанов В.С. Заметки о некоторых млекопитающих бассейна реки Пенжины. *Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический*. 1946; 51(4-5):91–101.
26. Коврижных В.В., Мезенцев Н.П. Случай бешенства в оленьем стаде. *Ветеринария*. 1960; 10:47.
27. Яковлева Т.А., Апалев Е.М., Трофимчик С.К. О бешенстве животных на Камчатке. В кн.: Барышникова А.И., редактор. Вопросы инфекционных заболеваний и производства вакцинно-сыровоточных препаратов. Хабаровск; 1967. С. 263–4.
28. Лазарев А.А. Значение промысловых зверей в распространении некоторых природно-очаговых заболеваний на Камчатке. В кн.: Язан Ю., редактор. VIII Всесоюзная конференция по природной очаговости болезней животных и охране их численности. Тезисы докладов. Киров; 1972. Т. 1. С. 103–4.
29. Лазарев А.А. Колебания численности и «тундровое бешенство» лисиц Камчатки. В кн.: Современное состояние и пути развития охотоведческой науки в СССР. Тезисы докладов. Киров; 1974. С. 96–7.
30. Кривошеев В.Г., Чернявский Ф.Б., Железнов Н.К., Тархов В.С. Новые данные о млекопитающих Анадырского края. В кн.: Фауна и зоогеография млекопитающих северо-востока Сибири. Владивосток; 1978. С. 66–94.
31. Савицкий В.П., Ботвинкин А.Д., Белко В.И., Майоров С.П., Сидельникова Н.Ф., Горюченко Л.Е. Эпидемиологические особенности бешенства на Дальнем Востоке. В кн.: Субботина Л.С., редактор. Современные методы в изучении природно-очаговых инфекций. Л.; 1979. С. 31–41.
32. Бернштейн А.Д., Ключева Е.В., Овчинникова И.Г. Природный очаг бешенства на о. Врангеля. В кн.: Вирусы и вирусные инфекции человека. Тезисы докладов. М.; 1981. С. 151–2.
33. Селимов М.Е., Королев М.Б., Татаров А.Г. Морфология вируса арктического бешенства. *Вопросы вирусологии*. 1984; 29(2):253–6.
34. Чернявский Ф.Б. Млекопитающие крайнего северо-востока Сибири. М.: Наука; 1984. 388 с.
35. Землянский И.А. Положение населения Камчатки во второй половине XIX века. В кн.: Камчатка – Россия – мир: забытые имена. Доклады международных исторических чтений. Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс; 2020. С. 89–94.
36. На Камчатке с начала года от укусов животных пострадало больше 500 человек. [Электронный ресурс]. URL: <https://kamchatinfo.com/news/safe/detail/27329> (дата обращения 28.04.2023).
37. Adelshin R.V., Melnikova O.V., Trushina Y.N., Botvinkin A.D., Borisova T.I., Andaev E.I., Verzhutsky D.B., Khangazhinov A.S., Balakhonov S.V. A new outbreak of fox rabies at the Russian-Mongolian border. *Virol. Sin.* 2015; 30(4):313–5. DOI: 10.1007/s12250-015-3609-0.
38. Черешнев И.А., редактор. Позвоночные звери Северо-Востока России. Владивосток: Дальнаука; 1996. 308 с.
39. Пшеничников А.В. Метод флюоресцирующих антител для исследований при «дикувании». *Ветеринария*. 1970; 2:102–3.
40. Schneider L.G., Barnard B.J.H., Schneider H.P., Ødegaard Ø.A., Muller J., Selimov M., Cox J.H., Wandeler A.I., Blancou J., Meyer S. Application of monoclonal antibodies for epidemiological investigation and oral vaccination studies. II. Arctic viruses. In: Kuwert E., Méricieux C., Koprowski H., Bögel K., editors. Rabies in the Tropics. Springer, Berlin, Heidelberg; 1985. P. 47–59. DOI: 10.1007/978-3-642-70060-6_6.
41. Kuzmin I.V. An arctic fox rabies virus strain as a cause of human rabies in Russian Siberia. *Arch. Virol.* 1999; 144(3):627–9. DOI: 10.1007/s007050050531.
42. Deviatkin A.A., Vakulenko Y.A., Dashian M.A., Lukashev A.N. Evaluating the impact of anthropogenic factors on the dissemination of contemporary cosmopolitan, Arctic, and Arctic-like rabies viruses. *Viruses*. 2022; 14(1):66. DOI: 10.3390/v14010066.
43. Fuglei E., Tarroux A. Arctic fox dispersal from Svalbard to Canada: one female's long run across sea ice. *Polar Research*. 2019; 38. DOI: 10.33265/polar.v38.3512.

References

1. Selimov M.A., Botvinkin A.D., Tatarov A.G. [Identification of strains of sylvatic and arctic rabies virus strains using monoclonal antibodies]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 1983; 28(3):243–4.
2. Kuzmin I.V., Hughes G.J., Botvinkin A.D., Gribencha S.G., Rupprecht C.E. Arctic and Arctic-like rabies viruses: distribu-

- tion, phylogeny and evolutionary history. *Epidemiol. Infect.* 2008; 136(4):509–19. DOI: 10.1017/S095026880700903X.
3. Nadin-Davis S.A., Falardeau E., Flynn A., Whitney H., Marshall H.D. Relationships between fox populations and rabies virus spread in northern Canada. *PLoS One*. 2021; 16(2):e0246508. DOI: 10.1371/journal.pone.0246508.
4. Kholodtsov F. [Essay on cattle breeding on the Kamchatka Peninsula. Part II]. In: [Information on the Veterinary-Sanitary State of the Primorsk Region. Book 4]. Vladivostok; 1913. P. 98–122.
5. Elton C. Epidemics among sledge dogs in the Canadian Arctic and their relation to disease in the arctic fox. *Can. J. Res.* 1931; 5(6):673–92. DOI: 10.1139/cjr31-106.
6. Sherstoboev K.N. [About the Kamchatka wildness of animals]. *Proceedings of the Irkutsk Research Veterinary Experimental Station*. 1949; (1):99–116.
7. Plummer P.J. Preliminary note on Arctic dog disease and its relationship to rabies. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 1947; 11(6):154–60.
8. Kantorovich R.A. [The etiology of “dikovanie” of animals in the Arctic. Communication 1. Biological properties of the wild virus]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 1956; (2):32–6.
9. Gondatti N.L. [A trip from the village Markovo on the river Anadyr, to Providence Bay (Bering Strait)]. In: [Notes of the Amur Department of the Imperial Russian Geographical Society]. Vol. 4. Iss. 1. Khabarovsk, 1898; P. 1–42.
10. Slyunin N.V. [Okhotsk-Kamchatka Territory: Natural-Historical Description (with a map)]. St. Petersburg: Publication of the Ministry of Finance; 1900. Vol. 1. P. 628–9.
11. Gryuner A.S. [The text part of the report on the veterinary and sanitary state of the Kamchatka Region for 1915]. *Arkhiv Veterinarnykh Nauk [Archives of Veterinary Sciences]*. 1916; (1):1384–429.
12. Turevich E.I., Tebyakina A.E. [Rabies and the so-called “dikovanie” of animals in the Arctic]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology]*. 1947; (2):17–25.
13. Egorov I.Ya., Maramovich A.S., Botvinkin A.D., editors. [Epidemiological Surveillance of Particularly Dangerous and Natural-Focal Infections under Conditions of the Far North]. Yakutsk: 2000; 341 p.
14. Lassen H.C. Paralytic human rabies in Greenland. *Lancet*. 1962; 1(7223):247–9. DOI: 10.1016/S0140-6736(62)91194-7.
15. Hueffer K., Murphy M. Rabies in Alaska, from the past to an uncertain future. *Int. J. Circumpolar Health*. 2018; 77(1):1475185. DOI: 10.1080/22423982.2018.1475185.
16. Poleshchuk E.M., Sidorov G.N., Nashatyreva D.N., Gradoboeva E.A., Pakskina N.D., Popova I.V. [Rabies in the Russian Federation. Information and Analytical Bulletin]. Omsk: KAN Publishing House; 2019. 110 p.
17. Poleshchuk E.M., Sidorov G.N. [Comparative analysis of features of epizootiological and epidemic situation and risk of rabies infection in the Russian Federation in early XXI century]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (4):16–25. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-16-25.
18. Revich B., Tokarevich N., Parkinson A.J. Climate change and zoonotic infections in the Russian Arctic. *Int. J. Circumpolar Health*. 2012; 71:18792. DOI: 10.3402/ijch.v71i0.18792.
19. Simon A., Beauchamp G., Bélanger D., Bouchard C., Fehlner-Gardiner C., Leconte N., Rees E., Leighton P.A. Ecology of Arctic rabies: 60 years of disease surveillance in the warming climate of northern Canada. *Zoonoses Public Health*. 2021; 68(6):601–8. DOI: 10.1111/zph.12848.
20. Botvinkin A.D., Sidorov G.N., Poleshchuk E.M., Zarva I.D., Nashatyreva D.N., Yakovchits N.V., Andaev E.I., Balakhonov S.V., Rudakov N.V. [Retrospective evaluation of implementation of long-term forecast on spatial spread of rabies in the Asian part of Russia]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):13–21. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-13-21.
21. [Overview of the Primorsk Region for 1901 and 1902. Overview of the Primorsk Region for 1902]. Vladivostok; 1905. P. 1–28.
22. Sokol'nikov N.P. [Hunting and game animals of the Anadyr Territory]. *Byulleten' Moskovskogo Obshchestva Ispytateley Prirody. Otdel Biologicheskoy [Bulletin of the Moscow Society of Naturalists. Department of Biology]*. 1927; 36(1-2):117–62.
23. Shmit E. [Rabies in the Kolyma District]. *Okhotnik [Hunter]*. 1930; (9-10):15–6.
24. Formozov A.N. [Fluctuations in the Number of Game Animals]. Moscow; Leningrad: All-Union Cooperative United Publishing House; 1935. 108 p.
25. Bazhanov V.S. [Notes on some mammals of the Penzhina river basin]. *Byulleten' Moskovskogo Obshchestva Ispytateley Prirody. Otdel Biologicheskoy [Bulletin of the Moscow Society of Naturalists. Department of Biology]*. 1946; 51(4-5):91–101.
26. Kovrizhnykh V.V., Mezentssev N.P. [Cases of rabies in a deer herd]. *Veterinariya [Veterinary]*. 1960; (10):47.
27. Yakovleva T.A., Apalev E.M., Trofimchik S.K. [On animal rabies in Kamchatka]. In: Baryshnikova A.I., editor. [Issues of Infectious Diseases and Production of Vaccine-Serum Preparations]. Khabarovsk; 1967. P. 263–4.
28. Lazarev A.A. [The importance of game animals in the spread of some natural-focal diseases in Kamchatka]. In: Yazan Yu., editor. [VIII All-Union Conference on the natural focalities of animal diseases and the protection of their numbers. Abstracts]. Kirov; 1972. Vol. 1. P. 103–4.
29. Lazarev A.A. [Population fluctuations and “tundra rabies” of Kamchatka foxes]. In: [The Current State and Ways of Development of Hunting Science in the USSR. Abstracts]. Kirov; 1974. P. 96–7.
30. Krivosheev V.G., Chernyavsky F.B., Zhelezov N.K., Tarkhov V.S. [New data on mammals of the Anadyr Territory]. In: [Fauna and Zoogeography of the North-East of Siberia]. Vladivostok; 1978. P. 66–94.
31. Savitsky V.P., Botvinkin A.D., Belko V.I., Maiorov S.P., Sidel'nikova N.F., Gorkovenko L.E. [Epidemiological features of rabies in the Far East]. In: Subbotina L.S., editor. [Modern Methods of Studying Natural-Focal Infections]. Leningrad; 1979. P. 31–41.
32. Bernstein A.D., Klyueva E.V., Ovchinnikova I.G. [The natural focus of rabies on Wrangel Island]. In: [Viruses and Human Viral Infections. Abstracts]. Moscow; 1981. P. 151–2.
33. Selimov M.E., Korolev M.B., Tatarov A.G. [Morphology of the Arctic rabies virus]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 1984; 29(2):253–6.
34. Chernyavsky F.B. [Mammals of the Extreme North-East of Siberia]. Moscow: Nauka; 1984. 388 p.
35. Zemlyansky I.A. [The status of the population of Kamchatka in the second half of the 19th century]. In: [Kamchatka – Russia – World: Forgotten Names: Reports of International Historical Readings]. Petropavlovsk-Kamchatsky: Kamchatpress; 2020. P. 89–94.
36. [More than 500 people have suffered from animal bites in Kamchatka since the beginning of the year]. (Cited 28 Apr 2023). [Internet]. Available from: <https://kamchatinfo.com/news/safe/detail/27329>.
37. Adelshin R.V., Melnikova O.V., Trushina Y.N., Botvinkin A.D., Borisova T.I., Andaev E.I., Verzhutsky D.B., Khangazhinov A.S., Balakhonov S.V. A new outbreak of fox rabies at the Russian-Mongolian border. *Virol. Sin.* 2015; 30(4):313–5. DOI: 10.1007/s12250-015-3609-0.
38. Chereshev I.A., editor. [Vertebrate Animals of the North-East of Russia]. Vladivostok: Dalnauka; 1996. 308 p.
39. Pshennikov A.V. [Method of fluorescent antibodies for researches at “dikovanie”]. *Veterinariya [Veterinary]*. 1970; (2):102–3.
40. Schneider L.G., Barnard B.J.H., Schneider H.P., Ødegaard Ø.A., Muller J., Selimov M., Cox J.H., Wandeler A.I., Blancou J., Meyer S. Application of monoclonal antibodies for epidemiological investigation and oral vaccination studies. II. Arctic viruses. In: Kuwert E., Mérieux C., Koprowski H., Bögel K., editors. Rabies in the Tropics. Springer, Berlin, Heidelberg; 1985. P. 47–59. DOI: 10.1007/978-3-642-70060-6_6.
41. Kuzmin I.V. An arctic fox rabies virus strain as a cause of human rabies in Russian Siberia. *Arch. Virol.* 1999; 144(3):627–9. DOI: 10.1007/s007050050531.
42. Deviatkin A.A., Vakulenko Y.A., Dashian M.A., Lukashov A.N. Evaluating the impact of anthropogenic factors on the dissemination of contemporary cosmopolitan, Arctic, and Arctic-like rabies viruses. *Viruses*. 2022; 14(1):66. DOI: 10.3390/v14010066.
43. Fuglei E., Tarroux A. Arctic fox dispersal from Svalbard to Canada: one female's long run across sea ice. *Polar Research*. 2019; 38. DOI: 10.33265/polar.v38.3512.

Authors:

Botvinkin A.D., Zarva I.D., Mel'nikov A.V. Irkutsk State Medical University, 1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003, Russian Federation. E-mail: rectorat@ismu.baikal.ru.

Chupin S.A. Federal Center for Animal Health. Micro-District Yur'evets, Vladimir, 600901, Russian Federation. E-mail: arriah@fsvps.gov.ru.

Mel'tsov I.V. Irkutsk State Agrarian University named after A.A. Ezhevsky. Molodezhny settlement, Irkutsk Region, 664038, Russian Federation. E-mail: rector@igsha.ru.

Об авторах:

Ботвинкин А.Д., Зарва И.Д., Мельников А.В. Иркутский государственный медицинский университет. Российская Федерация, 664003, Иркутск, ул. Красного Восстания, 1. E-mail: rectorat@ismu.baikal.ru.

Чупин С.А. Федеральный центр охраны здоровья животных. Российская Федерация, 600901, г. Владимир, мкр-н Юрьевец. E-mail: arriah@fsvps.gov.ru.

Мельцов И.В. Иркутский государственный аграрный университет имени А.А. Ежевского. Российская Федерация, 664038, Иркутская обл., Иркутский р-н, п. Молодежный. E-mail: rector@igsha.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-16-23

УДК 616.992:614.4

А.В. Липницкий, Н.В. Половец, А.А. Муругова, А.В. Топорков

Анализ и прогноз распространения в мире особо опасных микозов*ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация*

В обзоре представлен анализ публикаций за последние пять лет о глобальном распространении особо опасных (эндемических) микозов: кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза, бластомикоза, паракокцидиоидомикоза. Возбудители этих микозов – диморфные микромицеты, которые способны вызывать тяжелое течение заболевания, вплоть до летального исхода. Эти грибы существуют в определенных экологических нишах, однако в последние годы получено много сообщений о том, что они встречаются вне регионов с традиционно известной эндемичностью. Существуют потенциальные причины этих изменений, такие как глобальные факторы (климатические изменения, миграция) и повышенное использование иммуносупрессивных препаратов. Потепление климата может обеспечить благоприятные условия для роста *Coccidioides* spp. на новых территориях, в то время как продолжительные засушливые периоды и последующие пыльные бури приводят к повышению уровня заболеваемости кокцидиоидомикозом в уже установленных эндемических областях. В настоящее время существует предположение, что не только почва, но и грызуны являются первичным резервуаром *Coccidioides* во внешней среде. Гистоплазмоз эндемичен в странах Американского континента, но границы распространения возбудителя микоза до конца не определены. В Латинской Америке гистоплазмоз – одна из наиболее распространенных инфекций у ВИЧ-инфицированных, характеризующаяся высоким уровнем смертности. Многие эпидемиологические данные по бластомикозу получены из Северной Америки, меньше сведений из Африки и Азии. Случаи эндемических микозов у иммунокомпетентных путешественников обычно диагностируются ошибочно, вследствие отсутствия специфических симптомов. Также существует риск реактивации инфекции, даже по истечении длительного периода времени, у лиц с приобретенной иммуносупрессией. Изоляция патогенов из объектов внешней среды с использованием традиционных культуральных методов затруднена, внедрение молекулярно-генетических исследований позволит дополнить знания об эпидемиологии этих микозов.

Ключевые слова: особо опасные микозы, *Coccidioides* spp., *Histoplasma* spp., *Blastomyces* spp., эндемичные регионы.

Корреспондирующий автор: Липницкий Анатолий Васильевич, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Для цитирования: Липницкий А.В., Половец Н.В., Муругова А.А., Топорков А.В. Анализ и прогноз распространения в мире особо опасных микозов. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 4:16–23. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-16-23

Поступила 12.07.2023. Принята к публ. 12.09.2023.

A.V. Lipnitsky, N.V. Polovets, A.A. Murugova, A.V. Toporkov

Analysis and Forecast of the Spread of Particularly Dangerous Mycoses around the World*Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation*

Abstract. The literature review presents an analysis of publications over the past five years on the global distribution of particularly dangerous (endemic) mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, blastomycosis, paracoccidioidomycosis. The causative agents of these mycoses are dimorphic micromycetes, which can cause a severe course of the disease, even death. These fungi exist in specific ecological niches, but in recent years there have been many reports of them occurring outside of regions of traditionally known endemicity. There are potential causes for these changes, such as global factors (climate change, migration) and extensive use of immunosuppressive drugs. Climate warming may provide favorable conditions for the growth of *Coccidioides* spp. in new areas, while prolonged dry spells and subsequent dust storms result in increased incidence of coccidioidomycosis in already established endemic areas. Currently, there is an assumption that not only the soil, but also rodents are the primary reservoir of *Coccidioides* in the external environment. Histoplasmosis is endemic in the countries of the Americas, but the extent of spread of the causative agents has not been fully defined. In Latin America, histoplasmosis is one of the most common infections in HIV-infected people, with a high mortality rate. Many epidemiological data on blastomycosis come from North America, with less information from Africa and Asia. Cases of endemic mycoses in immunocompetent travelers are usually diagnosed incorrectly, due to the absence of specific symptoms. There is also a risk of reactivation of infection in persons with acquired immunosuppression, even after a long period of time. Isolation of pathogens from environmental objects using conventional cultural methods is difficult, while the introduction of molecular-genetic studies will supplement the knowledge about the epidemiology of these mycoses.

Key words: particularly dangerous mycoses, *Coccidioides* spp., *Histoplasma* spp., *Blastomyces* spp., endemic regions.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Anatoly V. Lipnitsky, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Citation: Lipnitsky A.V., Polovets N.V., Murugova A.A., Toporkov A.V. Analysis and Forecast of the Spread of Particularly Dangerous Mycoses around the World. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:16–23. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-16-23
Received 12.07.2023. Accepted 12.09.2023.

Lipnitsky A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7249-1820>
Polovets N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7823-2301>

Murugova A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7744-4441>
Toporkov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>

Особо опасные (эндемические) микозы (кокцидиомикоз, гистоплазмоз, бластомикоз и параккокцидиомикоз) – первичные инвазивные заболевания, вызываемые диморфными грибами. Их географическое распространение в мире исторически ограничивается определенными регионами, расположенными преимущественно на Американском континенте. Однако в последнее десятилетие отмечается постоянное увеличение заболеваемости этими микозами не только в известных эндемических очагах, но и за их пределами. Предполагается, что прирост числа инфицированных может быть обусловлен повышением антропогенной деятельности на эндемических территориях и внутренней миграцией населения в эти регионы. В последние годы активно развивается сельское хозяйство, ведутся работы по жилищному строительству и установлению солнечных батарей на новых территориях. Вышеперечисленные факторы приводят к нарушению почвенного покрова и попаданию возбудителей особо опасных микозов (ООМ) в воздух [1, 2]. Естественные события, такие как землетрясения, пыльные бури и пожары, также обуславливают повышение заболеваемости кокцидиомикозом [3]. Отмечена возможность инфицирования военного персонала, проводящего учения и тренировки на открытом воздухе [4]. Увеличение в популяции доли пожилых людей со многими хроническими заболеваниями, нарушение клеточного иммунитета при СПИДе, после трансплантации, вследствие иммуносупрессивной терапии являются факторами риска, способствующими повышению числа клинически выраженных случаев особо опасных микозов. Климатические изменения также являются факторами риска инфицирования микозами. В публикациях последних лет отмечается, что в связи с глобальным повышением температуры происходит формирование новых областей, соответствующих условиям обитания возбудителей особо опасных микозов, что в свою очередь может привести к расширению эндемичных регионов [5–7].

Клинические симптомы особо опасных микозов схожи с таковыми многих респираторных заболеваний бактериальной и вирусной природы, что значительно осложняет их диагностику и получение точных эпидемиологических данных о границах их распространения. Кроме того, недавно появились сведения о заболеваниях, вызванных ранее неизвестными диморфными микромицетами.

В представленном обзоре анализируются материалы публикаций по распространению в мире эндемических микозов за последние пять лет и представлен прогноз заболеваемости ими в последующие годы.

Кокцидиомикоз (КМ), известный также как Долинная лихорадка (Valley fever), встречается в ре-

гионах Америки с жарким сухим климатом. Случаи заболевания КМ подлежат обязательному уведомлению Центра контроля и предупреждения заболеваемости США (CDC) в 26 штатах [8]. Наибольшее количество случаев КМ зарегистрировано в двух штатах юго-запада США – Аризоне и Калифорнии. По данным CDC за период с 2010 по 2014 г., суммарно в этих двух штатах ежегодно фиксировалось порядка 15 тыс. случаев КМ. В Калифорнии с 2000 по 2018 г. заболеваемость КМ возросла от 2,4 до 18,8 случая на 100 тыс. населения, что составляет 800 % [9–11]. Истинное число заболевших, по-видимому, в 6–14 раз выше, поскольку у 60 % инфицированных отмечается бессимптомное течение заболевания или клиническая картина варьирует и напоминает другие респираторные инфекции [12]. Лишь в 5 % случаев возникают жизнеугрожающие формы КМ, которые требуют обязательной госпитализации [13]. Существует мнение, что ежегодное количество заболевших КМ в США составляет около 350 тыс. человек [14]. Некоторые эксперты полагают, что в связи с климатическими изменениями число инфицированных в мире может повыситься к 2050 г. на 164 % [15].

Проведенный нами анализ еженедельных сводок CDC за 2018–2022 гг. показал, что ежегодно наибольшее количество зарегистрированных в США случаев КМ по-прежнему отмечается в двух штатах (Аризона, Калифорния), что составляет более 95 % от общей заболеваемости КМ в США. Однако важно отметить, что кроме Калифорнии, Аризоны и граничащих с юго-западом США штатов (Невада, Юта, Нью-Мексико) за последние пять лет заболеваемость КМ неизменно наблюдалась и в таких штатах, расположенных вдали от известных эндемических районов, как Монтана, Мичиган, Миннесота – на севере, Огайо – на востоке и Канзас, Небраска – в центральной части США. ДНК *Coccidioides* была обнаружена в почвенных образцах, собранных на северо-западе США – в штате Орегон [16].

С 2018 по 2022 г. основная заболеваемость КМ в эндемических очагах США отмечалась среди лиц, не связанных общим источником возбудителя инфекции. Однако в июле 2021 г. в Калифорнии зафиксирована вспышка КМ у семи государственных служащих, принимавших участие в тушении пожара на эндемичной территории [17]. Работа всех пострадавших проводилась в условиях тесного контакта с пылью без использования средств индивидуальной защиты органов дыхания. Клинические проявления КМ (кашель, боль в груди, одышка) отмечались в начале заболевания у всех инфицированных, а в двух случаях болезнь прогрессировала.

КМ ежегодно описывается в странах Центральной (Гватемала, Гондурас, Никарагуа) и

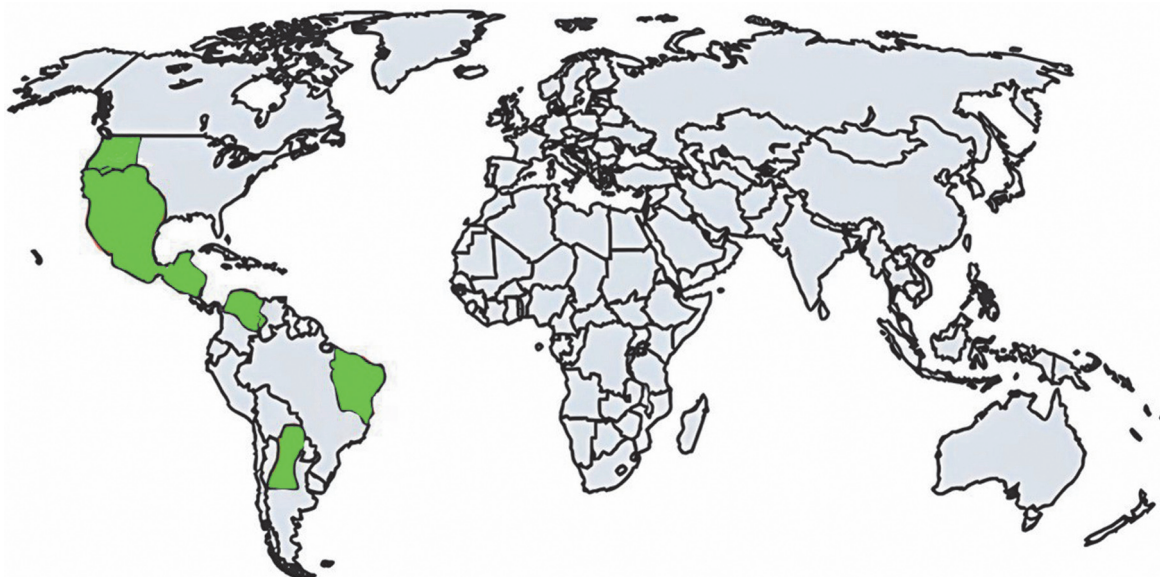


Рис. 1. Ареал возбудителей кокцидиоидомикоза

Fig. 1. Areal of the causative agents of coccidioidomycosis

Южной (Аргентина, Боливия, Парагвай, Венесуэла, Колумбия, Бразилия) Америки (рис. 1). В этих регионах возбудителей КМ из почвы выделяют крайне редко – возможно, это связано с ограниченным использованием современных методов исследования. Так, показано, что применение ПЦР в режиме реального времени значительно повышает чувствительность как самого метода, так и процент обнаружения возбудителей КМ в пробах [18].

Экологические ниши двух видов грибов – возбудителей КМ (*C. immitis* и *C. posadasii*) остаются слабо изученными. До настоящего времени ведущим является предположение, что *Coccidioides* spp. является почвенным сапротрофом. Однако J.W. Taylor и B. Barker [19] опубликовали альтернативное мнение, согласно которому тканевая (сферульная) форма *Coccidioides* в неактивном состоянии располагается в гранулах легких мелких грызунов и трансформируется в спорообразующие гифы после гибели животных. Таким образом, жизненный цикл возбудителя КМ существенно зависит от макроорганизма. Роль животных – обитателей эндемичных очагов КМ изучена и другими авторами. D.R. Kollath *et al.* [20] при исследовании методом ПЦР 465 образцов почвы из Аризоны в 105 (23 %) пробах обнаружили ДНК *Coccidioides* spp., причем большинство положительных результатов (95) получено из материала, собранного в норах грызунов. Более того, существует гипотеза о том, что некоторые грибы из порядка Onygenales, к которому принадлежит род *Coccidioides*, могут быть частью нормальной микрофлоры легких человека [21]. Несомненно, что окончательный вывод о роли животных как источника возбудителей КМ требует проведения дополнительных исследований.

До настоящего времени не существует убедительных доказательств наличия автохтонных слу-

чаев КМ вне Американского континента. Однако в двух публикациях из Китая представлены подобные данные. X.L. Wang *et al.* [22] при ретроспективном анализе всех ранее описанных случаев КМ в Китае предположили возможность местного инфицирования пациентов. Позднее G. Liang *et al.* [23] провели детальный анализ 39 случаев КМ в 14 провинциях Китая. Всего в период с 1958 по 2000 г. диагноз КМ был установлен у 9 человек, обратившихся за медицинской помощью, начиная с 2000 г. – у 30 пациентов. Из выборки авторы исключили ряд случаев заболевания ввиду отсутствия необходимой информации. Установлено, что 10 человек в прошлом посещали США, в то время как у 16 (51,6 %) не выявлено ни посещения эндемичных регионов, ни возможных контактов с импортированными из них товарами. Такие случаи в основном отмечены у жителей провинции Фудзянь, которая располагается в восточной прибрежной зоне Китая. В заключительном обсуждении авторы полагают, что несколько случаев КМ в Китае являются автохтонными.

Нельзя не упомянуть о том, что в условиях пандемии, вызванной коронавирусом (SARS-CoV-2), описаны случаи коинфекции КМ и COVID-19. Оба заболевания часто возникают при наличии факторов риска, включающих иммуносупрессию, пожилой возраст, неконтролируемый диабет и беременность [24]. Пациенты с осложнениями после заболевания легких при КМ подвержены риску развития более тяжелых форм COVID-19. С другой стороны, у больных с COVID-19 возможна реактивация КМ и других особо опасных микозов, особенно при длительном лечении иммуносупрессивными препаратами. Кроме того, SARS-CoV-2 способствует нарушению регуляции клеточного иммунитета, повышая уровень провоспалительных цитокинов и снижая количество Т-клеток, что также обуславливает мани-

фестацию латентных форм особо опасных микозов [25, 26].

Гистоплазмоз вызывается двумя вариантами вида *Histoplasma capsulatum*: *H. capsulatum* var. *capsulatum* и *H. capsulatum* var. *duboisii*. Хотя эти микромицеты – первичные патогены, они также являются причиной тяжелых форм заболевания у пациентов с иммуносупрессией, особенно у больных СПИДом [27]. Недавно Панамериканский отдел Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) опубликовал руководство по диагностике и контролю диссеминированного гистоплазмоза у больных ВИЧ с рекомендациями по применению коммерческих наборов для быстрой детекции антигена *Histoplasma* в образцах от больных и других современных методов диагностики *in vitro* [28].

Случаи гистоплазмоза не подлежат обязательному уведомлению CDC, однако департаменты здравоохранения в 12 штатах ведут учет таких диагнозов. Отсутствие единой системы предоставления информации приводит к несоответствию статистических данных, публикуемых CDC, и сведений о фактической ежегодной госпитализации больных с гистоплазмозом. Так, согласно информации, полученной в рамках проекта по анализу затрат на медицинские услуги (Healthcare Cost and Utilization Project) в США, количество лиц, находящихся на стационарном лечении с диагнозом «гистоплазмоз», составляет более 5000, в то время как аналитические ресурсы CDC сообщают лишь о 1000 случаях заболевания [29].

Согласно сложившейся тенденции, отмечается расширение регионов существования возбудителя гистоплазмоза в США, Канаде, а также большинстве стран Латинской Америки и Карибского бассейна [30–35]. В последние годы все чаще регистрируют случаи местного гистоплазмоза в европейских странах [36–38]. Автохтонные случаи заболевания свиде-

тельствуют о появлении новых экологических ниш с благоприятными условиями для роста и развития *H. capsulatum* в Европейском регионе.

Основным источником возбудителей гистоплазмоза является почва, содержащая экскременты птиц и летучих мышей [39]. Большинство описанных вспышек гистоплазмоза связано с разрушением верхних слоев почвы и вдыханием пыли и частиц гриба, однако в некоторых случаях пути инфицирования не выявлены [40].

Случаи заболевания гистоплазмозом описаны у диких (барсуки, ежи, крысы черные, летучие мыши) и домашних (кошки, собаки, лошади) животных в Германии, Швейцарии, Италии, Албании, Франции, Дании, Австрии, Венгрии и Испании [41], что свидетельствует о потенциале распространения возбудителя гистоплазмоза вне традиционных регионов (рис. 2).

H. capsulatum var. *duboisii* эндемичен для таких стран Африканского континента, как Нигер, Нигерия, Сенегал, Республика Конго, Уганда, Гвинея-Бисау, Сомали, Кения, Мозамбик, Демократическая Республика Конго, Центральноафриканская Республика, Танзания и Республика Мадагаскар [32, 42, 43].

Однако даже с учетом современных сведений о мировом распространении гистоплазмоза совершенно неожиданной явилась публикация в октябре 2022 г. сообщения L.M. Moreiza *et al.* [44] о выявлении с помощью молекулярных методов ДНК *H. capsulatum* в почве и экскрементах пингвинов в Антарктике на территории специальной антарктической защитной зоны, расположенной на острове Короля Георга. Летом 2020 г. авторы исследовали 9 образцов экскрементов пингвинов, 3 образца меха морских котиков и 8 образцов поверхностного слоя почвы. Для исследования проб использовали метод ПЦР с праймерами к различным ДНК-мишеням, включая уникальную



Рис. 2. Ареал возбудителей гистоплазмоза

Fig. 2. Areal of the causative agents of histoplasmosis

для возбудителя гистоплазмоза последовательность генов, кодирующих белок с молекулярной массой 100 кДа (Hsp100). В последующем было проведено секвенирование продуктов амплификации. В качестве положительного контроля использовали референтный штамм *H. capsulatum* G2178. В результате секвенирования ампликонов ДНК гриба выявлена в двух из восьми образцов почвы и в трех из девяти образцов экскрементов пингвинов. При сравнении полученных нуклеотидных последовательностей с базой данных GenBank выявлена высокая степень гомологии со штаммами латиноамериканской линии (LAmA2/LAmB1) *H. capsulatum*. Авторы предполагают возможность переноса гриба на Антарктический континент мигрирующими птицами. В местах их присутствия состав почвы достаточно благоприятен для роста *H. capsulatum*, хотя средняя температура в Антарктике ниже оптимальной. Ранее при исследовании образцов зимнего сезонного снега в Антарктике были выделены штаммы 26 различных родов грибов, в том числе *Penicillium chrysogenum*, принадлежащего к оппортунистическим патогенам, способным вызывать заболевания у лиц с иммуносупрессией [45].

Возбудители **бластомикоза** – грибы рода *Blastomyces* [46]. В 2013 г. Е.М. Brown *et al.* [47], используя филогенетический анализ шести генетически различных локусов, разделили *Blastomyces* на два вида: существующий до этого времени единственный возбудитель бластомикоза *B. dermatitidis* и *B. gilchristii*. Предполагается, что *B. gilchristii* вызывает только поражение легких, тогда как *B. dermatitidis* – и диссеминированные формы микоза [48]. Недавно описан новый вид – *B. helicus*, встречающийся на западе США и в Канаде [49], однако сведения о нем весьма ограничены. Вызываемые им заболевания встречаются в основном у иммунокомпрометированных

субъектов и домашних животных (собак и кошек). При этом клиническая картина заболевания более тяжелая, чем после инфицирования двумя другими возбудителями.

Существует тенденция роста заболеваемости бластомикозом к северу от эндемичных регионов (рис. 3) [50]. Авторы отметили почти девятикратное повышение ежегодного количества случаев бластомикоза в 2016–2019 гг. по сравнению с 2000–2015 гг. в центральной части штата Нью-Йорк. S. Lohrenz *et al.* [51] описали 15 случаев бластомикоза в Саскачеване, Канада, из которых 9 не были связаны с посещением известных эндемичных регионов этой страны.

Паракокцидиоидомикоз (ПКМ) вызывается двумя видами *Paracoccidioides*: *P. brasiliensis* и *P. lutzii* [52]. В 2017 г. D.A. Turassini *et al.* [53], основываясь на данных секвенирования генома, предложили разделить *P. brasiliensis* на четыре различных вида: *P. brasiliensis sensu stricto*, *P. americana*, *P. restrepiensis* и *P. venezueleusis*. Однако пока эти виды не включены в Международный код ботанической номенклатуры.

Экологические факторы внешней среды, способствующие укоренению возбудителей ПКМ, включают наличие тропических и субтропических лесов, достаточно высокий уровень осадков (2000–3000 мм/год), температуру меньше 27 °C и бедные почвы.

Культуры патогена выделены от многих диких и домашних животных, среди которых важную роль играют броненосцы.

ПКМ обнаруживается только в Латинской Америке (рис. 4), преимущественно в Бразилии, Венесуэле и Колумбии, и в настоящее время определяется ВОЗ как «забытая» тропическая болезнь [54]. Ретроспективное изучение госпитализированных пациентов в эндемичных странах Центральной и

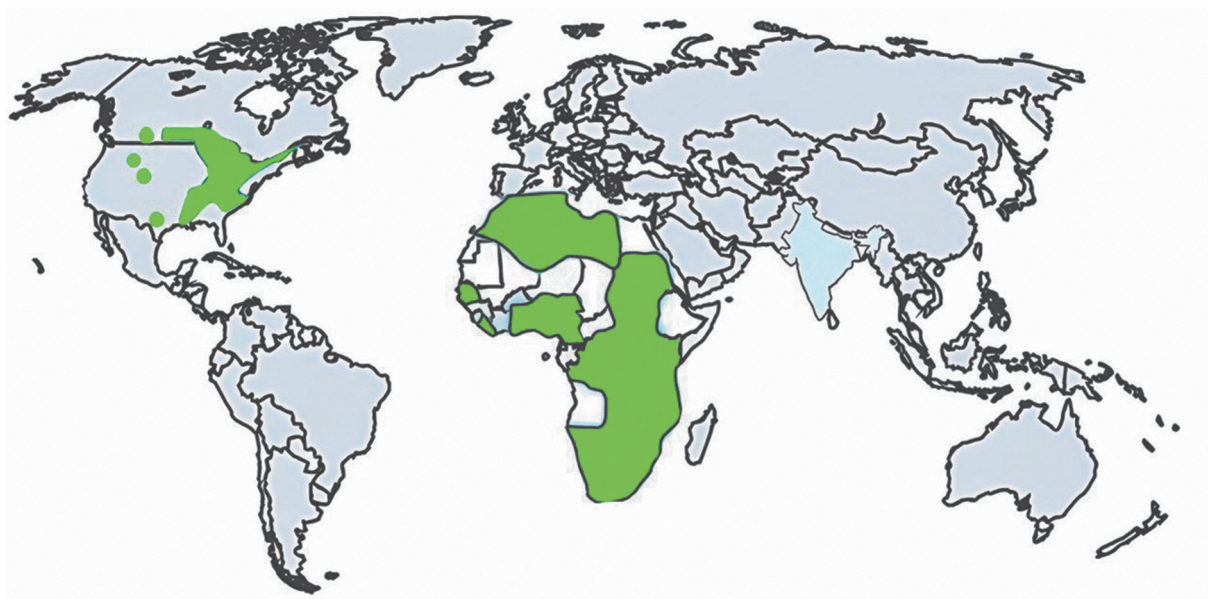


Рис. 3. Ареал возбудителей бластомикоза

Fig. 3. Areal of the causative agents of blastomycosis



Рис. 4. Ареал возбудителей паракокцидиоидомикоза

Fig. 4. Areal of the causative agents of paracoccidioidomycosis

Южной Америки свидетельствует о том, что количество больных ПКМ значительно выше официальных данных о заболеваемости этим микозом [55].

В последние годы появились сообщения о распространении в мире заболеваний, вызванных диморфными грибами, не соответствующими таксономии уже известных возбудителей особо опасных микозов [56]. В 2013 г. описаны микозы у ВИЧ-инфицированных пациентов в Южной Африке, вызванные ранее неизвестным диморфным патогеном, близким к роду *Emmonsia* [57]. Позднее I.S. Schwartz *et al.* [58] опубликовали новые данные о 39 случаях диссеминированной болезни с кожными и легочными поражениями у субъектов с выраженной иммуносупрессией. Многим из них ранее был ошибочно поставлен диагноз «туберкулез». Около половины заболевших умерли. В 2017 г. подобные *Emmonsia* изоляты, ретроспективно выявленные в коллекциях грибов по всему миру, реклассифицированы в новый род *Emergomyces* (*Es*) [56]. В настоящее время он включает пять видов: *Es. africanus*, *Es. pasteurianus*, *Es. canadiensis*, *Es. orientalis* и *Es. europaeus* [59]. По-видимому, имеются и другие диморфные микроорганизмы, принадлежащие к этому роду. Однако клиническая значимость и регионы распространения грибов *Emergomyces* пока остаются неизвестными.

Таким образом, современные данные литературы по распространению в мире особо опасных микозов свидетельствуют, что в большинстве стран микотические инфекции являются серьезной проблемой для общественного здравоохранения. В настоящее время отмечено расширение границ известных ранее эндемичных регионов и фактически происходит переоценка границ природных очагов возбудителей особо опасных микозов, которые были определены более 50 лет назад. Необходимо отметить, что существует ряд ограничений в получении точных эпиде-

миологических данных, связанных с отсутствием системы национального эпидемиологического надзора за ООМ и ограничением номенклатуры лабораторных исследований за пределами эндемичных регионов. Представленная в статье информация может служить основой для оценки рисков завоза ООМ из неблагополучных по этим инфекциям стран на территорию Российской Федерации.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

References / Список литературы

1. Wilken J.A., Sondermeyer G., Shusterman D., McNary J., Vugia D.J., McDowell A., Borenstein P., Gilliss D., Ancock B., Prudhomme J., Gold D., Windham G.C., Lee L., Materna B.L. Coccidioidomycosis among workers constructing solar power farms, California, USA, 2011–2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(11):1997–2005. DOI: 10.3201/eid2111.150129.
2. Freedman M., Jackson B.R., McCotter O., Benedict K. Coccidioidomycosis outbreaks, United States and worldwide, 1940–2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(3):417–23. DOI: 10.3201/eid2403.170623.
3. Tong D.Q., Wang J.X.L., Gill T.E., Lei H., Wang B. Intensified dust storm activity and Valley fever infection in the southwestern United States. *Geophys. Res. Lett.* 2017; 44(9):4304–12. DOI: 10.1002/2017GL073524.
4. Crum N.F. Coccidioidomycosis: A contemporary review. *Infect. Dis. Ther.* 2022; 11(2):713–42. DOI: 10.1007/s40121-022-00606-y.
5. Coopersmith E.J., Bell J.E., Benedict K., Shriber J., McCotter O., Cosh M.H. Relating coccidioidomycosis (valley fever) incidence to soil moisture conditions. *Geohealth.* 2017; 1(1):51–63. DOI: 10.1002/2016GH000033.
6. Gorris M.E., Cat L.A., Zender C.S., Treseder K.K., Randerson J.T. Coccidioidomycosis dynamics in relation to climate in the southwestern United States. *Geohealth.* 2018; 2(1):6–24. DOI: 10.1002/2017GH000095.
7. Gorris M.E., Neumann J.E., Kinney P.L., Sheahan M., Sarofim M.C. Economic valuation of coccidioidomycosis (Valley fever) projections in the United States in response to climate change. *Weather Clim. Soc.* 2021; 13(1):107–23. DOI: 10.1175/wcas-d-20-0036.1.

8. Benedict K., McCotter O.Z., Brady S., Komatsu K., Sondermeyer Cooksey G.L., Nguyen A., Jain S., Vugia D.J., Jackson B.R. Surveillance for coccidioidomycosis – United States, 2011–2017. *MMWR Surveill. Summ.* 2019; 68(7):1–15. DOI: 10.15585/mmwr.ss6807a1.
9. Sondermeyer Cooksey G.L., Nguyen A., Vugia D., Jain S. Regional analysis of coccidioidomycosis incidence – California, 2000–2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2020; 69(48):1817–21. DOI: 10.15585/mmwr.mm6948a4.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Valley fever (coccidioidomycosis) statistics. (Cited 06 July 2023). [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/coccidioidomycosis/statistics.html>.
11. Smith D.J., Williams S.L.; Endemic Mycoses State Partners Group; Benedict K.M., Jackson B.R., Toda M. Surveillance for coccidioidomycosis, histoplasmosis, and blastomycosis – United States, 2019. *MMWR Surveill. Summ.* 2022; 71(7):1–14. DOI: 10.15585/mmwr.ss7107a1.
12. Williams S.L., Chiller T. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of coccidioidomycosis. *J. Fungi (Basel)*. 2022; 8(7):666. DOI: 10.3390/jof8070666.
13. McCotter O.Z., Benedict K., Engelthaler D.M., Komatsu K., Lucas K.D., Mohle-Boetani J.C., Oltean H., Vugia D., Chiller T.M., Sondermeyer Cooksey G.L., Nguyen A., Roe C.C., Wheeler C., Sunenshine R. Update on the epidemiology of coccidioidomycosis in the United States. *Med. Mycol.* 2019; 57(Supplement_1):S30–S40. DOI: 10.1093/mmy/myy095.
14. Van Dyke M.C.C., Thompson G.R., Galgiani J.N., Barker B.M. The rise of *Coccidioides*: forces against the dust devil unleashed. *Front. Immunol.* 2019; 10:2188. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02188.
15. Weaver E.A., Kolivras K.N. Investigating the relationship between climate and Valley fever (coccidioidomycosis). *EcoHealth*. 2018; 15(4):840–52. DOI: 10.1007/s10393-018-1375-9.
16. Coates S.J., Fox L.P. Disseminated coccidioidomycosis as a harbinger of climate change. *JAAD Case Reports*. 2018; 4(5):424–25. DOI: 10.1016/j.jidcr.2017.11.017.
17. Donnelly M.A.P., Maffei D., Sondermeyer Cooksey G.L., Ferguson T.J., Jain S., Vugia D., Materna B.L., Kamali A. Notes from the field: coccidioidomycosis outbreak among wildland firefighters – California, 2021. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2022; 71(34):1095–6. DOI: 10.15585/mmwr.mm7134a4.
18. Bowers J.R., Parise K.L., Kelley E.J., Lemmer D., Schupp J.M., Driebe E.M., Engelthaler D.M., Keim P., Barker B.M. Direct detection of *Coccidioides* from Arizona soils using CoccENV, a highly sensitive and specific real-time PCR assay. *Med. Mycol.* 2019; 57(2):246–55. DOI: 10.1093/mmy/myy007.
19. Taylor J.W., Barker B.M. The endozoan, small-mammal reservoir hypothesis and the life cycle of *Coccidioides* species. *Med. Mycol.* 2019; 57(Supplement_1):S16–S20. DOI: 10.1093/mmy/myy039.
20. Kollath D.R., Teixeira M.M., Funke A., Miller K.J., Barker B.M. Investigating the role of animal burrows on the ecology and distribution of *Coccidioides* spp. in Arizona soils. *Mycopathologia*. 2019; 185(1):145–59. DOI: 10.1007/s11046-019-00391-2.
21. Hamm P.S., Taylor J.W., Cook J.A., Natvig D.O. Decades-old studies of fungi associated with mammalian lungs and modern DNA sequencing approaches help define the nature of the lung mycobio. *PLoS Pathog.* 2020; 16(7):e1008684. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008684.
22. Wang X.L., Wang S., An C.L. Mini-review of published reports on coccidioidomycosis in China. *Mycopathologia*. 2015; 180(5-6):299–303. DOI: 10.1007/s11046-015-9935-9.
23. Liang G., Shen Y., Lv G., Zheng H., Mei H., Zheng X., Kong X., Bleichert O., Li D., Liu W. Coccidioidomycosis: Imported and possible domestic cases in China: A case report and review, 1958–2017. *Mycoses*. 2018; 61(7):506–13. DOI: 10.1111/myc.12750.
24. Heaney A.K., Head J.R., Broen K., Click K., Taylor J., Balmes J.R., Zelner J., Remais J.V. Coccidioidomycosis and COVID-19 co-infection, United States, 2020. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27(5):1266–73. DOI: 10.3201/eid2705.204661.
25. Frias-De-León M.G., Pinto-Almazán R., Hernández-Castro R., García-Salazar E., Meza-Meneses P., Rodríguez-Cerdeira C., Arenas R., Conde-Cuevas E., Acosta-Altamirano G., Martínez-Herrera E. Epidemiology of systemic mycoses in the COVID-19 pandemic. *J. Fungi (Basel)*. 2021; 7(7):556. DOI: 10.3390/jof7070556.
26. Krauth D.S., Jamros C.M., Rivard S.C., Olson N.H., Maves R.C. Accelerated progression of disseminated coccidioidomycosis following SARS-CoV-2 infection: A case report. *Mil. Med.* 2021; 186(11-12):1254–6. DOI: 10.1093/milmed/usab132.
27. Lockhart S.R., Toda M., Benedict K., Caceres D.H., Litvintseva A.P. Endemic and other dimorphic mycoses in The Americas. *J. Fungi (Basel)*. 2021; 7(2):151. DOI: 10.3390/jof7020151.
28. Pan American Health Organization and World Health Organization. Guidelines for diagnosing and managing disseminated histoplasmosis among people living with HIV. (Cited 06 July 2023). [Internet]. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665/252304>.
29. Benedict K., Derado G., Mody R.K. Histoplasmosis-associated hospitalizations in the United States, 2001–2012. *Open Forum Infect. Dis.* 2016; 3(1):ofv219. DOI: 10.1093/ofid/ofv219.
30. Maiga A.W., Deppen S., Scaffidi B.K., Baddley J., Aldrich M.C., Dittus R.S., Grogan E.L. Mapping *Histoplasma capsulatum* exposure, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(10):1835–9. DOI: 10.3201/eid2410.180032.
31. Benedict K., Thompson G.R. 3rd, Deresinski S., Chiller T. Mycotic infections acquired outside areas of known endemicity, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(11):1935–41. DOI: 10.3201/eid2111.141950.
32. Ashraf N., Kubat R.C., Poplin V., Adenis A.A., Denning D.W., Wright L., McCotter O., Schwartz I.S., Jackson B.R., Chiller T., Bahr N.C. Re-drawing the maps for endemic mycoses. *Mycopathologia*. 2020; 185(5):843–65. DOI: 10.1007/s11046-020-00431-2.
33. Brown E.M., McTaggart L.R., Dunn D., Pszczolko E., Tsui K.G., Morris S.K., Stephens D., Kus J.V., Richardson S.E. Epidemiology and geographic distribution of blastomycosis, histoplasmosis, and coccidioidomycosis, Ontario, Canada, 1990–2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(7):1257–66. DOI: 10.3201/eid2407.172063.
34. Armstrong P.A., Beard J.D., Bonilla L., Arboleda N., Lindsley M.D., Chae S.R., Castillo D., Nuñez R., Chiller T., de Perio M.A., Pimentel R., Vallabhaneni S. Outbreak of severe histoplasmosis among tunnel Workers-Dominican Republic, 2015. *Clin. Infect. Dis.* 2018; 66(10):1550–7. DOI: 10.1093/cid/cix1067.
35. Adenis A.A., Valdes A., Crozet C., McCotter O.Z., Derado G., Couppie P., Chiller T., Nacher M. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. *Lancet. Infect. Dis.* 2018; 18(10):1150–9. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30354-2.
36. Schmiedel Y., Büchi A.E., Berezowska S., Pöllinger A., Mühlethaler K., Funke-Chambour M. Autochthonous case of pulmonary histoplasmosis, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27(3):966–9. DOI: 10.3201/eid2703.191831.
37. Ashbee H.R., Evans E.G., Viviani M.A., Dupont B., Chrysanthou E., Surmont I., Tomsikova A., Vachkov P., Enero B., Zala J., Tintelnot K.; ECMM Working Group on Histoplasmosis. Histoplasmosis in Europe: report on an epidemiological survey from the European Confederation of Medical Mycology Working Group. *Med. Mycol.* 2008; 46(1):57–65. DOI: 10.1080/13693780701591481.
38. Antinori S., Giacomelli A., Corbellino M., Torre A., Schiuma M., Casalini G., Parravicini C., Milazzo L., Gervasoni C., Ridolfo A.L. Histoplasmosis diagnosed in Europe and Israel: A case report and systematic review of the literature from 2005 to 2020. *J. Fungi (Basel)*. 2021; 7(6):481. DOI: 10.3390/jof7060481.
39. Benedict K., Mody R.K. Epidemiology of histoplasmosis outbreaks, United States, 1938–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(3):370–8. DOI: 10.3201/eid2203.151117.
40. Benedict K., McCracken S., Signs K., Ireland M., Amburgey V., Serrano J.A., Christophe N., Gibbons-Burgener S., Hallyburton S., Warren K.A., Keyser Metobo A., Odom R., Groenewold M.R., Jackson B.R. Enhanced surveillance for histoplasmosis – 9 States, 2018–2019. *Open Forum Infect. Dis.* 2020; 7(9):ofaa343. DOI: 10.1093/ofid/ofaa343.
41. Wilmes D., Mayer U., Wohlsein P., Suntz M., Gerkrath J., Schulze C., Holst I., von Bomhard W., Rickerts V. Animal histoplasmosis in Europe: review of the literature and molecular typing of the etiological agents. *J. Fungi (Basel)*. 2022; 8(8):833. DOI: 10.3390/jof8080833.
42. Delveloux M., Amona F.M., Hennequin C. Histoplasmosis caused by *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*: A comprehensive review of cases from 1993 to 2019. *Clin. Infect. Dis.* 2021; 73(3):e543–e549. DOI: 10.1093/cid/ciaa1304.
43. Cipriano A., Neves-Maia J., Lopes V., Fleming C.E., Ferreira M.A., Bathay J. African histoplasmosis in a Guinea Bissau patient with HIV-2: Case report and review. *J. Mycol. Med.* 2020; 30(1):100904. DOI: 10.1016/j.mycmed.2019.100904.
44. Moreira L.M., Meyer W., Chame M., Brandão M.L., Vivoni A.M., Portugal J., Wanke B., Trilles L. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* in Antarctica. *Emerg. Infect. Dis.* 2022; 28(10):2100–4. DOI: 10.3201/eid2810.220046.
45. de Menezes G.C.A., Amorim S.S., Gonçalves V.N., Godinho V.M., Simões J.C., Rosa C.A., Rosa L.H. Diversity, distribution, and ecology of fungi in the seasonal snow of Antarctica. *Microorganisms*. 2019; 7(10):445. DOI: 10.3390/microorganisms7100445.
46. Schwartz I.S., Kauffman C.A. Blastomycosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2020; 41(1):31–41. DOI: 10.1055/s-0039-3400281.
47. Brown E.M., McTaggart L.R., Zhang S.X., Low D.E., Stevens D.A., Richardson S.E. Phylogenetic analysis reveals a cryptic species *Blastomyces gilchristii*, sp. nov. within the human pathogenic fungus *Blastomyces dermatitidis*. *PLoS One*. 2013; 8(3):e59237. DOI: 10.1371/journal.pone.0059237.

48. Meece J.K., Anderson J.L., Gruszka S, Sloss B.L., Sullivan B., Reed K.D. Variation in clinical phenotype of human infection among genetic groups of *Blastomyces dermatitidis*. *J. Infect. Dis.* 2013; 207(5):814–22. DOI: 10.1093/infdis/jis756.
49. Schwartz I.S., Wiederhold N.P., Hanson K.E., Patterson T.F., Sigler L. *Blastomyces helicus*, a new dimorphic fungus causing fatal pulmonary and systemic disease in humans and animals in Western Canada and the United States. *Clin. Infect. Dis.* 2019; 68(2):188–95. DOI: 10.1093/cid/ciy483.
50. Austin A., Tobin E., Judson M.A., Hage C.A., Hu K., Epelbaum O., Fantauzzi J., Jones D.M., Gilroy S., Chopra A. Blastomycosis in the capital district of New York State: A newly identified emerging endemic area. *Am. J. Med.* 2020; 134(2):e101–e108. DOI: 10.1016/j.amjmed.2020.09.017.
51. Lohrenz S., Minion J., Pandey M., Karunakaran K. Blastomycosis in Southern Saskatchewan 2000–2015: Unique presentations and disease characteristics. *Med. Mycol.* 2018; 56(7):787–95. DOI: 10.1093/mmy/myx131.
52. Martinez R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. *J. Fungi (Basel)*. 2017; 3(1):1. DOI: 10.3390/jof3010001.
53. Turissini D.A., Gomez O.M., Teixeira M.M., McEwen J.G., Matute D.R. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet. Biol.* 2017; 106:9–25. DOI: 10.1016/j.fgb.2017.05.007.
54. Griffiths J., Lopes Colombo A., Denning D.W. The case for paracoccidioidomycosis to be accepted as a neglected tropical (fungal) disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019; 13(5):e0007195. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007195.
55. Riera F.O., Caeiro J.P., Denning D.W. Burden of serious fungal infections in Argentina. *J. Fungi (Basel)*. 2018; (2):51. DOI: 10.3390/jof4020051.
56. Jiang Y., Dukik K., Muñoz J.F., Sigler L., Schwartz I.S., Govender N.P., Kenyon C., Feng P., van den Ende B.G., Stielow J.B., Stchigel A.M., Lu H., de Hoog S. Phylogeny, ecology and taxonomy of systemic pathogens and their relatives in *Ajellomycetaceae* (Onygenales): *Blastomyces*, *Emergomyces*, *Emmonsia*, *Emmonsiolelopsi*. *Fungal Diversity*. 2018; 90(1):245–91. DOI: 10.1007/s13225-018-0403-y.
57. Kenyon C., Bonorchis K., Corcoran C., Meintjes G., Lockett M., Lehloeny R., Vismer H.F., Naicker P., Prozesky H., van Wyk M., Bamford C., du Plooy M., Imrie G., Dlamini S., Borman A.M., Colebunders R., Yansouni C.P., Mendelson M., Govender N.P. A dimorphic fungus causing disseminated infection in South Africa. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(15):1416–24. DOI: 10.1056/NEJMoa1215460.
58. Schwartz I.S., Kenyon C., Lehloeny R., Claasens S., Spengane Z., Prozesky H., Burton R., Parker A., Wasserman S., Meintjes G., Mendelson M., Taljaard J., Schneider J.W., Beylis N., Maloba B., Govender N.P., Colebunders R., Dlamini S. AIDS-related endemic mycoses in Western Cape, South Africa, and clinical mimics: a cross-sectional study of adults with advanced HIV and recent-onset, Widespread Skin Lesions. *Open Forum Infect. Dis.* 2017; 4(4):ofx186. DOI: 10.1093/ofid/ofx186.
59. Friedman D.Z.P., Schwartz I.S. Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. *J. Fungi (Basel)*. 2019; 5(3):67. DOI: 10.3390/jof5030067.

Authors:

Lipnitsky A.V., Polovets N.V., Murugova A.A., Toporkov A.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Об авторах:

Липницкий А.В., Половец Н.В., Муругова А.А., Топорков А.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-24-31

УДК 616.928.8:615.371

Л.Ф. Стомба, О.В. Чухраля, Д.И. Павельев, Н.К. Черникова, С.В. Борисевич

Сравнение эффективности различных схем применения рекомбинантных векторных вакцин против лихорадки Эбола на основе вируса вакцины, штамм MVA*ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад, Российская Федерация*

Цель обзора – оценка применения вакцин на основе вируса вакцины, штамм MVA, и аденовирусных векторов для профилактики болезни, вызываемой вирусом Эбола. Рассмотрены рекомбинантные штаммы MVA, экспрессирующие антигенные детерминанты представителей семейства филовирусов как возможные кандидаты в вакцинные препараты. Применение этого вируса в качестве вакцинного вектора обусловлено отсутствием противооспенного популяционного иммунитета и его безопасностью для здоровых взрослых волонтеров, для детей, подростков и лиц, больных туберкулезом, людей в возрасте 56–80 лет, лиц, больных atopическим дерматитом, СПИДом. Кроме того, иммунизация вакциной на основе вируса вакцины, штамм MVA, не вызывает осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы. Доклиническая оценка иммуногенности и защитной эффективности проводилась на иммунокомпетентных и иммунокомпромиссных мышах, морских свинках, адаптированных к вирусу Эбола, обезьянах макаках-резусах и макаках *cynomolgus*. Представлены результаты экспериментов по созданию вакцин, экспрессирующих либо только вирусный гликопротеин, либо вирусный гликопротеин и структурный белок Vp40. Поскольку вспышки лихорадки Эбола и других филовирусных инфекций трудно спрогнозировать, были созданы мультивалентные вакцины, которые будут защищать против всех филовирусных видов. Клинические испытания по применению в одном и том же эксперименте вакцин на основе рекомбинантных аденовирусных векторов и штамма MVA подтвердили более выраженную безопасность вакцин на основе рекомбинантного штамма MVA. Результаты индуцированного гуморального и Т-клеточного иммунных ответов показали, что этот вектор целесообразнее применять в качестве бустерного при гетерологичной прайм/бустерной схеме иммунизации. Оценены схемы вакцинации для формирования сильного длительного иммунитета. Эпидемиологическое моделирование установило, что профилактическая иммунизация, вызывающая длительный иммунитет у здорового населения в местах с высоким эпидемическим риском, будет предпочтительнее для ограничения будущих вспышек по сравнению с кольцевой иммунизацией, что было показано в кампании по ликвидации натуральной оспы в мире. Повышенный уровень иммунитета, индуцируемый при прайм/бустерной схеме иммунизации, сохраняющийся в течение длительного времени, будет иметь преимущество над ускоренной кольцевой иммунизацией, когда длительность защиты является более важным фактором, чем скорость, с которой эта защита формируется.

Ключевые слова: вирус вакцины, штамм MVA, лихорадка Эбола, иммунизация, праймирование, бустирование, иммунодоминантные антигены, мультивалентные вакцины.

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

Для цитирования: Стомба Л.Ф., Чухраля О.В., Павельев Д.И., Черникова Н.К., Борисевич С.В. Сравнение эффективности различных схем применения рекомбинантных векторных вакцин против лихорадки Эбола на основе вируса вакцины, штамм MVA. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023; 4:24–31. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-24-31

Поступила 12.06.2023. Отправлена на доработку 15.06.2023. Принята к публ. 07.09.2023.

L.F. Stomba, O.V. Chukhralya, D.I. Pavel'ev, N.K. Chernikova, S.V. Borisevich

Comparison of the Efficacy of Different Schemes for Using Recombinant Vector Vaccines against Ebola Fever, Based on Vaccinia Virus, MVA Strain*48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation*

Abstract. The aim of this review was to investigate the use of the vaccines based on vaccinia virus, MVA strain, and adenovirus vectors for the prevention of Ebola virus disease. The recombinant MVA strains expressing antigen determinants of Filoviridae family representatives were assessed as possible candidates for vaccine preparations. Application of this virus as a vaccine vector is conditioned by the absence of herd immunity to smallpox and its safety for healthy adult volunteers, children, adolescents, individuals suffering from tuberculosis, persons aged 56–80 years, people with diagnosed atopic dermatitis, AIDS. Furthermore, immunization with the vaccine on the basis of vaccinia virus, MVA strain, does not cause complications associated with cardiovascular diseases. Preclinical trials on immunogenicity and protective efficiency were carried out on immune-competent and immune-compromised mice; guinea pigs adapted to Ebola virus; rhesus macaques and cynomolgus monkeys. Presented are the results of experiments on the creation of vaccines expressing either only viral glycoprotein or viral glycoprotein and structural protein Vp40. Given that Ebola fever and other filovirus infection outbreaks are hard to predict, multivalent vaccines that would be able to provide protection against all filovirus species were designed. Clinical trials on simultaneous use of the vaccines based on recombinant adenovirus vectors and MVA strain showed more pronounced safety of vaccines on the basis of recombinant MVA strain. Studies of humoral and T-cell immune responses have revealed that this vector is more suitable for booster vaccination in case of heterologous prime/booster immunization scheme. Vaccination regimens for forming strong durable immune responses have been analyzed. Epidemiological modeling provided evidence that preventive immunization leading to long-term immunity in healthy population in areas of high epidemic risk will be of greater benefit in terms of controlling

future outbreaks compared to ring immunization that was effective during smallpox eradication campaign. Increased immunity level, induced by prime/booster vaccination, persisting for a long period of time, will have an advantage over accelerated ring immunization; when the duration of protection is more significant than the speed it is formed at.

Key words: vaccinia virus, MVA strain, Ebola fever, immunization, priming, booster dose, immunodominant antigens, multivalent vaccines.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

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

Citation: Stovba L.F., Chukhraya O.V., Pavel'ev D.I., Chernikova N.K., Borisevich S.V. Comparison of the Efficacy of Different Schemes for Using Recombinant Vector Vaccines against Ebola Fever, Based on Vaccinia Virus, MVA Strain. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:24–31. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-24-31

Received 12.06.2023. **Revised** 15.06.2023. **Accepted** 07.09.2023.

Stovba L.F., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7985-5516>

Chukhraya O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2603-0860>

Pavel'ev D.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3204-1897>

Chernikova N.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1491-6293>

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

Лихорадка Эбола – тяжелое зооантропонозное заболевание, вызываемое вирусами рода *Ebolavirus* семейства *Filoviridae*. Первая вспышка этого заболевания, в результате которой заболели 318 человек, из которых 280 погибли [1], была зарегистрирована в 1976 г. в Демократической Республике Конго. Периодически вспышки лихорадки Эбола происходили в Габоне, Республике Конго, Демократической Республике Конго, вызвав заболевание у 1393 человек при 78 % летальных случаев. Ранее считали, что это эмерджентное заболевание, характерное только для региона Центральной Африки [2]. Однако в 2014 г. эпидемия лихорадки Эбола охватила Гвинею, Либерию, Сьерра-Леоне, Мали, Нигерию, Сенегал. Были и завозные случаи в Испанию, Великобританию и США [3]. Периодически в средствах массовой информации появляются сообщения о небольших вспышках этого заболевания в регионах Центральной Африки. Высокая летальность этого заболевания, большая скорость трансмиссии возбудителя обусловили необходимость создания вакцины против лихорадки Эбола.

Доклинические исследования вакцин против лихорадки Эбола. В последнее десятилетие созданы и оценены в доклинических исследованиях и клинических испытаниях вакцины против лихорадки Эбола на основе ДНК-вакцин, векторов на основе аденовирусов 3, 5, 26 и 35-го типов, везикулярного стоматита, парагриппа, везикулярного энцефаломиеелита лошадей, дефектного по репликации варианта с делетированным геном Vp30, цитомегаловируса и вируса вакцины, штамм MVA [4, 5].

Учитывая, что среди населения, проживающего в ареалах циркуляции вируса лихорадки Эбола, много лиц с иммунодефицитными заболеваниями и такими тяжелыми социально значимыми хроническими инфекциями, как туберкулез, гепатиты В и С, для их иммунизации потребуются максимально безопасные вакцинные препараты [5]. Применение вакцин на основе вируса вакцины, штамм MVA, обусловлено отсутствием противооспенного популяционного иммунитета и безопасностью этого штамма для здоровых взрослых волонтеров [6, 7], для детей, подростков и лиц, больных туберкулезом [8], людей в возрасте 56–80 лет [9], лиц, больных атопическим

дерматитом [10], СПИДом [11, 12]. Кроме того, иммунизация вакциной на основе вируса вакцины, штамм MVA, не вызывает осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы [13].

Поскольку большинство уже сконструированных вакцин против лихорадки Эбола на основе разных вирусных векторов экспрессировали полно-размерный гликопротеин вируса [5], то для оценки иммуногенности и защитной эффективности кандидатов в векторные вакцины на основе штамма MVA были созданы рекомбинантные штаммы со встроенными в тимидинкиназный ген генома вектора генов, экспрессирующих либо только вирусный гликопротеин (Gr), либо вирусный гликопротеин и структурный белок Vp40 штаммов Заир и Судан вируса Эбола, и один рекомбинант, экспрессирующий гены Gr и Vp40, но встроенные в ген гемагглютинаина векторного генома (MVA-Gr-Vp40). Одновременная экспрессия двух белков способствовала созданию вирусоподобных частиц (впч) [14].

Оценка иммуногенности полученных рекомбинантов при гомологичной прайм/бустерной схеме иммунизации BALB/c мышей выявила наличие IgG-антител против белка Gr у всех рекомбинантов и дополнительно против белка Vp40 во всех двойных рекомбинантах, а также наличие более высоких титров общих IgG-антител против белка Gr у двойных рекомбинантов. Это, видимо, обусловлено либо более высоким уровнем экспрессии гена Gr в двойных рекомбинантах, либо образованием впч. Все рекомбинантные векторы индуцировали природный иммунный ответ с продуцированием, наряду с IgG-антителами, интерферона-β, провоспалительных цитокинов и хемокинов. Кроме того, выявлено, что рекомбинанты со встроенными генами белков Gr и Vp40 вируса Эбола-Заир способны индуцировать кросс-реактивные антитела против вируса Эбола-Судан.

Защитная эффективность этих кандидатов в вакцины исследовалась на химерных мышках линии WT→IFNAR^{-/-} C57BL/6 при их заражении летальной дозой вирулентного вируса Эбола через 4 недели после однократной иммунизации. В результате установлено, что иммунизация мышек рекомбинантами вируса вакцины, штамм MVA, экспрессирующими

гликопротеин и структурный белок Vp40, индуцирует у них гуморальный иммунный ответ и частично защищает химерных мышей от заражения летальной дозой нативного вируса [14].

Доклиническая оценка векторной вакцины MVA-EBOV, также экспрессирующей гликопротеин и матриксный белок Vp40 вируса Эбола изолята Makona, была выполнена при гомологичной прайм/бустерной иммунизации морских свинок, адаптированных к вирусу Эбола, и обезьянах макаках-резусах при однократной и гомологичной прайм/бустерной иммунизации с последующим заражением животных летальной дозой возбудителя [15].

У всех вакцинированных морских свинок индуцировались антитела к экспрессируемым антигенам, титры которых повышались при бустировании. Животные были защищены от последующего летального заражения вирусом Эбола, при этом у них не наблюдалось никаких симптомов заболевания, даже снижения массы тела.

У всех иммунизированных макак-резусов при обеих схемах иммунизации индуцировались IgG-антитела, специфичные к белкам Gr и Vp40, титры которых ко дню заражения возбудителем были выше у животных в прайм/бустерной группе. После заражения летальной дозой возбудителя все обезьяны выжили, несмотря на развитие незначительной вирусемии, титры Gr-антител были приблизительно подобны в обеих группах, а титры Vp40-антител слегка выше в прайм/бустерной группе. После заражения титры нейтрализующих антител повышались в обеих группах животных до 1:160 у праймированных и 1:640 в прайм/бустерной группе.

Учитывая результаты полной защиты от гибели макак-резусов после заражения летальной дозой вируса Эбола при однократном введении, этот вакцинный препарат можно считать предпочтительным среди других векторных вакцин [15].

Поскольку вспышки лихорадки Эбола и других филовиральных инфекций трудно спрогнозировать, постольку существует необходимость создания мультивалентных вакцин против заболеваний, вызванных филовirusами. Учитывая свойство генома штамма MVA как вектора встраивать большие количества чужеродной информации, сконструирован рекомбинант MVA-BN-EBOV-VLP, в который встроили гены гликопротеина и матриксного белка Vp40 вируса Эбола, а также ген нуклеопротеина (Np) вируса Taï Forest, принадлежащего к тому же роду [16].

Экспрессируемые белки Gr и Vp40 образовывали впч, в которые включался и нуклеопротеин вируса Taï Forest. Кроме того, выявлено, что белки, экспрессируемые штаммом MVA, не встраивались в впч.

Иммуногенность этой вакцины была оценена при прайм/бустерной иммунизации мышей линии CBA/J 6–8-недельного возраста.

Полученные результаты свидетельствовали об индуцировании ИФА антител, а также клеточного иммунного ответа. Клеточный иммунный ответ был представлен Gr-специфическими CD8⁺ Т-клетками

(необходимо отметить, что иммунный ответ оценивался только на Gr-антиген, хотя авторы эксперимента уверены, что подобный ответ индуцируется к белкам и Vp40, и Np, поскольку доказано их присутствие в впч).

Это позволит создавать мультивалентные вакцины, которые будут эффективно экспрессировать иммунодоминантные антигены из разных филовirusов [16].

Как уже было сказано, время появления новых вспышек филовиральных инфекций непредсказуемо, в связи с чем существует необходимость получения мультивалентной профилактической вакцины, которая будет защищать против всех потенциально циркулирующих филовиральных видов. Так, были получены трехвалентная и четырехвалентная вакцины против лихорадки Эбола [17]. Эти мультивалентные вакцины содержали смесь трех или четырех рекомбинантных аденовирусных (Ad) векторов, каждый из которых экспрессировал по одному трансгену. Трехвалентная вакцина представлена Ad-векторами, экспрессирующими полноразмерные гликопротеины вирусов Ebola Zaire, Sudan Gulu и Marburg. В четырехвалентную вакцину добавлен Ad-рекомбинант, экспрессирующий Gr вируса Taï Forest. Для праймирования использовались векторы на основе Ad 26-го типа, а для бустирования – Ad 35-го типа или рекомбинантный штамм MVA-BN-Filo, экспрессирующий гликопротеины вирусов Ebola Mayinga, Sudan Gulu, Marburg Musoke и нуклеопротеин вируса Taï Forest. При бустировании рекомбинантной вакциной MVA-BN-Filo вырабатывались Gr-специфические антитела и Gr-специфический IFN- γ Т-клеточный ответ. Также установлена 100 % защита макак cynomolgus при заражении летальной дозой вируса Ebola Zaire.

Поскольку ген гликопротеина филовirusов достаточно консервативен, то мультивалентная вакцина, экспрессирующая этот ген из разных филовirusов, должна вызывать протективный иммунный ответ при вспышке заболевания, вызванного любым из филовirusов [17, 18]. Результаты оценки рекомбинантных вирусов вакцины, штамм MVA, экспрессирующих различные иммунодоминантные антигены вируса Эбола, в качестве векторных вакцин против лихорадки Эбола представлены в табл. 1.

Результаты клинических испытаний вакцин против лихорадки Эбола. После доказательств индуцирования иммунного ответа векторными вакцинами на основе вируса вакцины, штамм MVA, у лабораторных животных были проведены клинические испытания этих вакцин на волонтерах.

В ходе слепого, рандомизированного, плацебо-контролируемого испытания, проведенного в США и Мали в октябре 2014 – феврале 2015 г., оценивалась безопасность и иммуногенность разных доз ($1 \cdot 10^{10}$, $2,5 \cdot 10^{10}$, $5 \cdot 10^{10}$, $1 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц) моновалентной вакцины ChAd3-EBO-Z, сконструированной на основе аденовируса шимпанзе (Ad 3-го типа) [19]. В испытании участвовали 20 волонтеров из США в возрасте 18–65 лет и 91 волонтер из Мали

Таблица 1 / Table 1

 Результаты доклинической оценки рекомбинантных штаммов MVA, экспрессирующих различные иммунодоминантные антигены вируса Эбола
 Results of preclinical assessment of recombinant vaccinia virus MVA strains expressing different immunodominant antigens of Ebola virus

Лабораторная модель Laboratory model	Схема иммунизации Regimen of immunization	Характеристика векторов, используемых для праймирования Characteristics of vectors used for priming			Характеристика векторов, используемых для бустирования Characteristics of vectors used for booster vaccination			Индуцированный иммунный ответ Induced immune response		Защитная эффективность при заражении летальной дозой вируса Эбола Protective efficacy in case of challenging with lethal dose of Ebola virus	Источник литературы References
		Вакцина Vaccine	Вирусный вектор Virus vector	Встроенные гены Inserted genes	Вакцина Vaccine	Вирусный вектор Virus vector	Встроенные гены Inserted genes	гуморальный humoral	клеточный cellular		
BALB/c мыши BALB/c mice	Прайм/буст Prime/boost	MVA-EBOV(Zair)	MVA	Gp EbolaZair	MVA-EBOV(Zair)	Gp Ebola Zair	+	+	Частичная для мышей WT→IFNAR-/- C57BL/6 Partial for mice WT→IFNAR-/- C57BL/6	14	
		MVA-SUDV(Sudan)		Gp EbolaSudan	MVA-SUDV(Sudan)	Gp Ebola Sudan					
		MVA-Gp-2AVp40(Zair)		Gp-Vp40 EbolaZair	MVA-Gp-2A-Vp40(Zair)	Gp-Vp40 Ebola Zair					
		MVA-Gp-2AVp40(Sudan)		Gp-Vp40 Ebola Sudan	MVA-Gp-2A-Vp40(Sudan)	Gp-Vp40 Ebola Sudan					
		MVA-Gp-Vp40		Gp-Vp40 Ebola Zair	MVA-Gp-Vp40	Gp-Vp40 Ebola Zair					
Морские свинки Guinea pigs	Однократно Single dose	MVA-EBOV		Gp-Vp40 Ebola Makona	MVA-EBOV	Не исследовали Not studied	Gp-Vp40 Ebola Makona	Не исследовали Not studied	Полная для морских свинок и макак-резусов Complete for guinea pigs and rhesus macaques	15	
Макаки-резус Macaques rhesus		MVA-BN-EBOV-VLP			MVA-BN-EBOV-VLP						Gp, VP40 Ebola Mayinga, NP Tai Forest
CBA/J мыши CBA/J mice	Прайм/буст Prime/boost	MVA-BN-EBOV-VLP		MVA	Gp, VP40 Ebola Mayinga, NP Tai Forest	MVA-BN-EBOV-VLP	Gp, VP40 Ebola Mayinga, NP Tai Forest	+	Не исследовали Not studied	16	
Макаки Cynomolgus macaques		Смесь Ad векторов 26-го типа Mixture of Ad vectors type 26		Ad вектор 26-го типа Ad vector type 26	Gp Ebola Zair, Sudan Gulu, Tai Forest Marburg;	MVA-BN-Filo	Gp Ebola Mayinga, Sudan Gulu, Marburg; NP Tai Forest				Полная для макак Cynomolgus Complete for cynomolgus macaques

в возрасте 18–50 лет. Все волонтеры были здоровы. Преимущество использования Ad шимпанзе по сравнению с другими аденовирусами объясняется тем фактом, что не зафиксировано ни одного случая заболевания человека, спровоцированного этим вирусом, и поэтому к нему нет предсуществующего иммунитета. Рекомбинантная вакцина экспрессировала Gp вируса Ebola Zair. Волонтеры в обеих странах однократно иммунизировались разными дозами вакцины. Доза $1 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц оценивалась для применения в кольцевой иммунизации. Из 91 волонтера только в Мали через 13 недель после праймирования вакциной ChAd3-EBO-Z 56 человек отбирались для одноразового бустирования вакциной MVA-BN-Filo [17].

Оценка безопасности примененных вакцин выявила, что побочные реакции после вакцинации ChAd3-EBO-Z в основном характеризовались лихорадкой, которая длилась в течение одних суток, утомлением, головной болью, миалгией, артралгией, ознобом, тошнотой, лимфопенией, тромбоцитопенией, которые проходили к исходу седьмых суток. Побочные реакции после применения вакцины MVA-BN-Filo менее выражены, представлены лихорадкой, болезненностью в месте введения, головной болью и утомлением, которые проходили через двое суток.

Оценка иммуногенности вакцины ChAd3-EBO-Z выявила, что гуморальный иммунный ответ, представленный IgG к вирусу Ebola Zair, отмечался у всех волонтеров, иммунизированных разными дозами вакцины, но был значительно выше у волонтеров, иммунизированных дозой $1 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц. Бустирование вакциной MVA-BN-Filo увеличивало геометрическое значение титров антител к Gp вируса Ebola Zair в 36 раз. Антитела к Gp вируса Ebola Zair персистировали значительно дольше у волонтеров, иммунизированных более высокими дозами вакцины ChAd3-EBO-Z. Т-клеточный иммунный ответ после введения вакцины ChAd3-EBO-Z был незначительным и выявлялся только у 31 % волонтеров, при этом представлен либо $CD4^+$ -Т клетками, либо только $CD8^+$. После бустирования вакциной MVA-BN-Filo количество волонтеров, у которых подтверждено наличие Т-клеточного иммунного ответа, представленного IFN- γ , TNF- α , IL-2 цитокинами, увеличивалось до 85 %.

Результаты индуцированного иммунного ответа показали, что только иммунизация дозой $1 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц вызывала реципрокные титры 1000 и выше, что при экстраполяции на данные, полученные для приматов, сможет обеспечить защиту людей от летального заражения [20, 21]. Таким образом, кольцевую вакцинацию целесообразно применять для иммунизации людей, ухаживающих за больными, что будет прерывать трансмиссию возбудителя здоровым людям. В целом примененная здесь схема иммунизации будет преимущественной для индуцирования длительного иммунитета [19].

Безопасность и иммуногенность самой вакцины MVA-EBO-Z и ее применение в качестве бустерной

оценивалось в открытом испытании фазы I, проведенном в Великобритании и Сенегале в мае – сентябре 2015 г. [22]. В испытании участвовали здоровые волонтеры в возрасте 18–50 лет, 38 человек из Великобритании и 40 – из Сенегала. Сама вакцина MVA-EBO-Z исследовалась в дозах $1 \cdot 10^8$ и $1,5 \cdot 10^8$ БОЕ. При гетерологичной прайм/бустерной схеме вакцинации для праймирования использовалась вакцина ChAd3-EBO-Z на основе Ad шимпанзе в дозе $3,6 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц, о которой упоминалось ранее [19], а для бустирования – вакцина MVA-EBO-Z в дозе $1 \cdot 10^8$ БОЕ с интервалом между праймированием и бустированием в 7 или 28 суток. Обе вакцины экспрессировали Gp вируса Ebola. Побочные реакции оценивались в течение 7 суток после каждой из вакцинаций.

После применения вакцины MVA-EBO-Z отмечались мягкие побочные реакции, выражающиеся, в основном по одному случаю, покраснением, болезненностью, легким раздражением в месте введения, артралгией, утомлением и тошнотой. После вакцинации ChAd3-EBO-Z к перечисленным побочным реакциям добавлялись припухлость, лихорадка, миалгия, головная боль, недомогание, которые были отмечены у нескольких человек. Большинство побочных реакций проходили спонтанно через 1–2 суток. Гуморальный иммунный ответ, представленный Gp-специфическим IgG к вирусу Ebola, индуцировался у волонтеров из всех групп, однако титры его у волонтеров в группе вакцинированных только вакциной MVA-EBO-Z были значительно ниже, чем в других группах. Титры IgG-антител, индуцированные у волонтеров в прайм/бустерных группах после бустирования через 7 суток, не отличались от таковых при бустировании через 28 суток.

Клеточный иммунный ответ, характеризующийся в основном Gp-специфическим IFN- γ , был значительно выше у волонтеров при прайм/бустерной схеме иммунизации, чем при вакцинации только вакциной MVA-EBO-Z. Значительных различий в уровнях индуцированного клеточного иммунного ответа после бустирования через 7 и 28 суток не наблюдалось.

Результаты исследования показали, что иммунизация только вакциной MVA-EBO-Z индуцирует менее выраженный иммунный ответ, чем при ее применении в качестве бустерной при гетерологичном бустировании. Сравнение уровней иммунного ответа при различных временных параметрах между праймированием и бустированием (7 и 28 суток) не выявило значительных различий между показателями гуморального и клеточного иммунитета, что свидетельствует о возможности применения кольцевой иммунизации при интервале между праймированием и бустированием в 7 суток. Авторы статьи также предполагают, что примененная здесь прайм/бустерная схема иммунизации векторными вакцинами ChAd3-EBO-Z и MVA-EBO-Z может стать преимущественной при вакцинации обслуживающего персонала больниц и населения, проживающего

на территории со спорадически вспышками лихорадки Эбола [23].

С целью исследования безопасности и иммуногенности в прайм/бустерной схеме иммунизации двумя вакцинами Ad26.ZEBOV и MVA-BN-Filo в Великобритании в декабре 2014 – октябре 2015 г. проведено слепое, рандомизированное, плацебо-контролируемое испытание, в котором участвовали 87 здоровых волонтеров в возрасте 18–50 лет [24]. Вакцина Ad26.ZEBOV, экспрессировавшая Gp вируса Ebola Zair, сконструирована на основе дефектного по репликации Ad 26-го типа, при этом данное испытание являлось первой клинической проверкой вакцины на основе этого возбудителя.

Волонтеры были разделены на 4 группы по 18 человек. Первые две группы праймированы вакциной MVA-BN-Filo и бустированы на 28-е или 56-е сутки вакциной Ad26.ZEBOV. Две других праймированы вакциной Ad26.ZEBOV и бустированы вакциной MVA-BN-Filo также на 28-е или 56-е сутки.

Для оценки необходимости более короткой схемы кольцевой иммунизации была создана дополнительная группа из 15 человек, которых праймировали вакциной Ad26.ZEBOV и бустировали вакциной MVA-BN-Filo на 15-е сутки. Все волонтеры не были ранее иммунизированы ни против лихорадки Эбола, ни против натуральной оспы, ни против аденовируса.

Оценка безопасности вакцины Ad26.ZEBOV, проводившаяся в течение 21 суток после каждой иммунизации, выявила наличие побочных реакций: эритем, припухлостей и болезненности в месте введения вакцины, а у 5 волонтеров наблюдались головная боль, миалгия, тошнота, утомление озноб и лихорадка. Вакцинация MVA-BN-Filo проходила практически бессимптомно.

Определение уровня гуморального иммунного ответа показало наличие антител к Gp вируса Эбола к 28-м суткам у 90 и 100 % волонтеров в группах, праймированных вакциной Ad26.ZEBOV, и у 79 % через 14 суток в дополнительной группе. После праймирования вакциной MVA-BN-Filo антитела выявлялись у 40 и 6,7 % волонтеров соответственно. Через 21 сутки после бустирования максимальный уровень гуморального иммунного ответа индуцировался у пациентов, праймированных вакциной Ad26.ZEBOV и бустированных через 56 суток вакциной MVA-BN-Filo.

Т-клеточный иммунный ответ, оцененный по наличию IFN- γ к Gp вируса Эбола, был также выше при схеме праймирования вакциной Ad26.ZEBOV и бустирования вакциной MVA-BN-Filo. Он усиливался после соответствующего бустирования, проведенного через 56 суток, и выявлялся у 100 % волонтеров.

Условия проведения клинических испытаний с применением рекомбинантов вируса вакцины, штамм MVA, приведены в табл. 2 и 3.

Ввиду проявленного низкого иммунного ответа при праймировании вакциной MVA-BN-Filo этот вектор предлагается использовать только для гете-

рологического бустирования. Эпидемиологическое моделирование установило, что профилактическая иммунизация, вызывающая длительный иммунитет у здорового населения в местах с высоким эпидемическим риском, будет предпочтительнее для ограничения будущих вспышек по сравнению с кольцевой иммунизацией, что было показано в кампании по ликвидации натуральной оспы в мире [25]. Повышенный уровень иммунитета, индуцируемый при прайм/бустерной схеме иммунизации, сохраняющийся в течение длительного времени, будет иметь преимущество над ускоренной кольцевой иммунизацией, когда длительность защиты является более важным фактором, чем скорость, с которой эта защита формируется.

Таким образом, оценка иммуногенности и защитной эффективности вакцин на основе рекомбинантных вирусов вакцины, штамм MVA, установила, что экспрессия генов белка Gp и структурного белка Vp40 вируса Эбола способствует образованию вирусоподобных частиц, на которые индуцируется иммунный ответ, способный защитить иммунокомпромированных мышей WT $\rightarrow$ IFNAR $^{-/-}$ C57BL/6, морских свинок, адаптированных к вирусу Эбола, обезьян макак-резусов и суномолгус от заражения летальной дозой нативного вируса.

Зарубежными специалистами создана мультивалентная рекомбинантная вакцина MVA-BN-EBOV-VLP, экспрессирующая гены Gp и Vp40 вируса Эбола и Np вируса Taï Forest, которая индуцировала гуморальный и клеточный иммунный ответы. Использование для бустирования вакцины MVA-BN-Filo при праймировании смесью трех или четырех аденовирусных векторов индуцировало гуморальный и клеточный иммунный ответы, которые обуславливали 100 % защиту макак суномолгус.

В клинических испытаниях установлено, что вакцины MVA-BN-Filo и MVA-EBO-Z вызывают местные побочные реакции, значительно более легкие, чем вызываемые рекомбинантами на основе Ad-векторов. Использование этих вакцин при праймировании индуцирует более слабый иммунный ответ, чем наблюдаемый при применении векторов на основе Ad шимпанзе и Ad 26-го типа. Сделан вывод, что вакцины на основе вируса вакцины, штамм MVA, предпочтительнее использовать для бустирования в прайм/бустерной схеме. Выбраны схемы кольцевой иммунизации: однократная иммунизация большой дозой вакцины ChAd3-EBO-Z, праймирование вакциной ChAd3-EBO-Z и бустирование через 7 суток вакциной MVA-EBO-Z, праймирование вакциной Ad26.ZEBOV и бустирование через 15 суток MVA-BN-Filo.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Таблица 2 / Table 2

Условия проведения клинических испытаний вакцин на основе рекомбинантных штаммов MVA в прайм/бустерной схеме иммунизации
Conditions of clinical trials of vaccines based on recombinant vaccinia virus MVA strains, in case of prime/booster immunization regime

Характеристика вакцины, используемой при праймировании Characteristics of vaccine used for priming					Характеристика вакцины, используемой при бустировании Characteristics of vaccine used for boosting					Источник литературы References
Вакцина Vaccine	Вирусный вектор Virus vector	Экспрессируемые гены Expressed genes	Доза вакцины Vaccine dose	Метод введения Method of administration	Вакцина Vaccine	Вирусный вектор Virus vector	Экспрессируемые гены Expressed genes	Доза вакцины Vaccine dose	Метод введения Method of administration	
ChAd3-EBO-Z	Ad шимпанзе Ad chimpanzee	Gp Ebola Zair	1·10 ¹⁰ , 2,5·10 ¹⁰ , 5·10 ¹⁰ , 1·10 ¹¹ вирусных частиц 1·10 ¹⁰ , 2,5·10 ¹⁰ , 5·10 ¹⁰ , 1·10 ¹¹ virus particles	в/м i/m	MVA-BN-Filo	MVA	Gp Ebola Zair, Sudan Gulu, Marburg; NP Tai Forest	2·10 ⁸ БОЕ 2·10 ⁸ PFU	в/м i/m	19
MVA-EBO-Z	MVA		1·10 ⁸ , 1,5·10 ⁸ БОЕ 1·10 ⁸ , 1,5·10 ⁸ PFU		Не исследовали Not studied					22
ChAd3-EBO-Z	Ad шимпанзе Ad chimpanzee		3,6·10 ¹⁰ вирусных частиц 3,6·10 ¹⁰ virus particles		MVA-EBO-Z	MVA	Gp Ebola Zair	1·10 ⁸ БОЕ 1·10 ⁸ PFU	5·10 ¹⁰ вирусных частиц 5·10 ¹⁰ virus particles	в/м i/m
MVA-BN-Filo	MVA	1·10 ⁸ ЦПД ₅₀ 1·10 ⁸ TCID ₅₀	Ad26.ZEBOV	Ad 26-го типа Ad vector type26	1·10 ⁸ ЦПД ₅₀ 1·10 ⁸ TCID ₅₀					
Ad26.ZEBOV	Ad 26-го типа Ad type 26	Gp Ebola Zair	5·10 ¹⁰ вирусных частиц 5·10 ¹⁰ virus particles		MVA-BN-Filo	MVA	Gp Ebola Zair, Sudan Gulu, Marburg; NP Tai Forest			

Таблица 3 / Table 3

Результаты иммуногенности вакцин на основе рекомбинантных штаммов MVA в прайм/бустерной схеме иммунизации, проявленные в клинических испытаниях
Immunogenicity of vaccines based on recombinant vaccinia virus MVA strains in case of prime/booster immunization under clinical trials

Вакцина Vaccine		Временной интервал между праймированием и бустированием Time interval between priming and boosting		Индуцированный иммунный ответ Induced immune response		Источник литературы References	
для праймирования / for priming	для бустирования / for boosting			Гуморальный / Humoral	Клеточный / Cellular		
ChAd3-EBO-Z	MVA-BN-Filo	13 недель / 13 weeks		+		19	
MVA-EBO-Z	Не проводили / Not carried out						
ChAd3-EBO-Z	MVA-EBO-Z	7 суток / 7 days				22	
		28 суток / 28 days					
		29 суток / 29 days					
MVA-BN-Filo	Ad26.ZEBOV	57 суток / 57 days					24
		29 суток / 29 days					
		57 суток / 57 days					
Ad26.ZEBOV	MVA-BN-Filo	15 суток / 15 days					
		MVA-BN-Filo					

References / Список литературы

- [Corporate Author]. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. Report of an International Commission. *Bull. World Health Organ.* 1978; 56(2):271-93.
- Le Roy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., Délicat A., Paweska J.T., Gonzalez J.P., Swanepoel R. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature.* 2005; 438(7068):575-6. DOI: 10.1038/438575a.
- World Health Organization. Ebola Virus Disease. Situation Report. 26 May 2016. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/206924/1/ebolasitrep26May2016eng.pdf?ua=1>.
- Wong G., Mendoza E.J., Plummer F.A., Gao G.F., Kobinger G.P., Qiu X. From bench to almost bedside: the long road to a licensed Ebola virus vaccine. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2018; 18(2):159-73. DOI: 10.1080/14712598.2018.1404572.
- Dolzhikova I.V., Tokarskaya E.A., Dzharullaeva A.S., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Voronina O.L., Syromyatnikova S.I., Borisevich S.V., Pantyukhov V.B., Babira V.F., Kolobukhina L.V., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Virus-vectored Ebola vaccines. *Acta Naturae.* 2017; 9(3):4-11.
- Sridhar S. Clinical development of Ebola vaccines. *Ther. Adv. Vaccines.* 2015; 3(5-6):125-38. DOI: 10.1177/2051013615611017.
- Frey S.E., Winokur P.L., Salata R.A., EL-Kamary S.S., Turley C.B., Walter E.B. Jr, Hay C.M., Newman F.K., Hill H.R., Zhang Y., Chaplin P., Tary-Lehmann M., Belshe R.B. Safety and immunogenicity of IMVAMUNE® smallpox vaccine using different strategies for a post event scenario. *Vaccine.* 2013; 31(29):3025-33. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.04.050.
- Ndiaye B.P., Thieneman F., Ota M., Landry B.S., Camara M., Dieye S. Safety, immunogenicity, and efficacy of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A in healthy adults infected with HIV-1: a randomized, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet. Respir. Med.* 2015; 3(3):190-200. DOI: 10.1016/S2213-2600(15)00037-5.
- Greenberg R.N., Hay C.M., Stapleton J.T., Marbury T.C., Wagner E., Kreitmeyer E., Rösch, von Krempelhuber A., Young P., Nichols R., Meier T.P., Schmidt D., Weigl J., Virgin G., Arndt-Wiedemann N., Chaplin P. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase II trial investigating the safety and immunogenicity of modified vaccinia Ankara smallpox vaccine (MVA-BN®) in 56-80-year-old subjects. *PLoS One.* 2016; 11(6):e0157335. DOI: 10.1371/journal.pone.0157335.
- Greenberg R.N., Hurley M.Y., Dinh V.D., Mraz S., Vera J.G., von Bredow D., von Krempelhuber A., Roesch S., Virgin G., Arndt-Wiedemann N., Meyer T.P., Schmidt D., Nichols R., Young P., Chaplin P. A multicenter, open-label, controlled phase II study to evaluate safety and immunogenicity of MVA smallpox vaccine (IMVAMUNE) in 18-40 year old subjects with diagnosed atopic dermatitis. *PLoS One.* 2015; 10(10):e0138348. DOI: 10.1371/journal.pone.0138348.
- Greenberg R.N., Overton E.T., Haas D.W., Frank I., Goldman M., von Krempelhuber A., Virgin G., Bädeker N., Vollmar J., Chaplin P. Safety, immunogenicity, and surrogate markers of clinical efficacy for modified vaccinia Ankara as a smallpox vaccine in HIV-infected subjects. *J. Infect. Dis.* 2013; 207(5):749-58. DOI: 10.1093/infdis/jis753.
- Overton E.T., Stapleton J., Frank I., Haasler S., Goepfert P.A., Barker D., Wagner E., von Krempelhuber A., Virgin G., Meyer T.P., Müller J., Bädeker N., Grünert R., Young P., Rösch S., MacLennan J., Arndt-Wiedemann N., Chaplin P. Safety and immunogenicity of modified vaccinia Ankara-Bavarian Nordic smallpox vaccine in vaccinia-naïve and experienced human immunodeficiency virus-infected individuals: An open-label, controlled clinical phase II trial. *Open Forum Infect. Dis.* 2015; 2(2):ofv040. DOI: 10.1093/ofid/ofv040.
- Zitzman-Roth E.-M., von Sonnenburg F., de la Motte S., Arndt-Wiedemann N., von Krempelhuber A., Ueber L., Vollmar J., Virgin G., Chaplin P. Cardiac safety of modified vaccinia Ankara for vaccination against smallpox in a young, healthy study population. *PLoS One.* 2015; 10(4):e0122653. DOI: 10.1371/journal.pone.0122653.
- Lázaro-Frías A., Gómez-Medina S., Sánchez-Sampedro L., Ljungberg K., Ustav M., Liljeström P., Muñoz-Fontela C., Esteban M., García-Arriaza J. Distinct immunogenicity and efficacy of poxvirus-based vaccine candidates against Ebola virus expressing GP and VP40 proteins. *J. Virol.* 2018; 92(11):e00363-18. DOI: 10.1128/JVI.00363-18.
- Domi A., Feldman F., Basu R., McCurley N., Shifflett K., Emanuel J., Hellerstein M.S., Guirakhoo F., Orlandi C., Flinko R., Lewis G.K., Hanley P.W., Feldmann H., Robinson H.L., Marzi A. A single dose of modified vaccinia Ankara expressing Ebola virus like particles protects nonhuman primates from lethal Ebola virus challenge. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):864. DOI: 10.1038/s41598-017-19041-y.
- Schweneker M., Laimbacher A.S., Zimmer G., Wagner S., Schraner E.M., Wolfstätter M., Klingenberg M., Dirmeier U., Steigerwald R., Lauterbach H., Hochrein H., Chaplin P., Suter M., Hausmann J. Recombinant modified vaccinia virus Ankara geering Ebola virus-like particles. *J. Virol.* 2017; 91(11):e00343-17. DOI: 10.1128/JVI.00343-17.
- Callendret B., Vellinga J., Wunderlich K., Rodrigues A., Steigerwald R., Dirmeier U., Cheminay C., Volkman A., Brasel T., Carrion R., Giavedoni L.D., Patterson P.B., Mire C.E., Geisbert T.W., Hooper J.W., Weijens M., Hartkoorn-Pasma J., Custers J., Grazia Pau M., Schuitemaker H., Zahn R. A prophylactic multivalent vaccine against different filovirus species is immunogenetic and provides protection from lethal infections with Ebolavirus and Marburgvirus species in non-human primates. *PLoS One.* 2018; 13(2):e0192312. DOI: 10.1371/journal.pone.0192312.
- Hensley L.E., Mulangu S., Asiedu C., Johnson J., Honko A.N., Stanley D., Fabbio G., Nichol S.T., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Wahl-Jensen V., Bailey M., Jahrling P.B., Roederer M., Koup R.A., Sullivan N.J. Demonstration of cross-protective vaccine immunity against an emerging pathogenic Ebolavirus species. *PLoS Pathog.* 2010; 6(5):e1000904. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000904.
- Tapia M.D., Sow S.O., Lyke K.E., Haidara F.C., Diallo F., Doumbia M., Traore A., Coulibaly F., Kodio M., Onwuchekwa U., Szein M.B., Wahid R., Campbell J.D., Kieny M.P., Moorthy V., Imoukhuede E.B., Rampling T., Roman F., De Ryck I., Bellamy A.R., Dally L., Mbaya O.T., Ploquin A., Zhou Y., Stanley D.A., Bailer R., Koup R.A., Roederer M., Ledgerwood J., Hill A.V.S., Ballou W.R., Sullivan N., Graham B., Levine M.M. Use of ChAd3-EBO-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo: a phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet. Infect. Dis.* 2016; 16(1):31-42. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00362-X.
- Stanley D.A., Honko A.N., Asiedu C., Trefry J.C., Lau-Kilby A.W., Johnson J.C., Hensley L., Ammendola V., Abbate A., Grazioli F., Foulds K.E., Cheng C., Wang L., Donaldson M.M., Colloca S., Folgori A., Roederer M., Nabel G.J., Mascola J., Nicosia A., Cortese R., Koup R.A., Sullivan N.J. Chimpanzee adenovirus vaccine generates acute and durable protective immunity against Ebolavirus challenge. *Nat. Med.* 2014; 20(10):1126-29. DOI: 10.1038/nm.3702.
- Plotkin S.A., Gilbert P.B. Nomenclature for immune correlates of protection after vaccination. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54(11):1615-7. DOI: 10.1093/cid/cis238.
- Venkataraman N., Ndiaye B.P., Bowyer G., Wade D., Sridhar S., Wright D., Powlson J., Ndiaye I., Diéye S., Thompson C., Bakhoum M., Morter R., Capone S., Del Sorbo M., Jamieson S., Rampling T., Datto M., Roberts R., Poulton I., Griffiths O., Ballou W.R., Roman F., Lewis D.J.M., Lawrie A., Imoukhuede E., Gilbert S.C., Dieye T.N., Ewer K.J., Mboup S., Hill A.V.S. Safety and immunogenicity of a heterologous prime-boost Ebola virus vaccine regimen in healthy adults in the United Kingdom and Senegal. *J. Infect. Dis.* 2019; 219(8):1187-97. DOI: 10.1093/infdis/jiy639.
- Dahlke C., Lunemann S., Kasonta R., Kreuels B., Schmiedel S., Ly M.L., Fehling S.K., Strecker T., Becker S., Altfeld M., Sow A., Lohse A.W., Muñoz-Fontela C., Addo M.M. Comprehensive characterization of cellular immune responses following Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* 2017; 215(2):287-92. DOI: 10.1093/infdis/jiw508.
- Milligan I.D., Gibani M.M., Sewell R., Clutterbuck E.A., Campbell D., Pledsted E., Nuthall E., Voysey M., Silva-Reyes L., McElrath M.J., De Rosa S.C., Frahm N., Cohen K.W., Shukarev G., Orzabal N., van Duynhoven W., Truysers C., Bachmayer N., Splinter D., Samy N., Pau M.G., Schuitemaker H., Luhn K., Callendret B., Van Hoof J., Douoguih M., Ewer K., Angus B., Pollard A.J., Snape M.D. Safety and immunogenicity of novel adenovirus type 26 - and modified vaccinia Ankara - vectored Ebola vaccine: A randomized clinical trial. *JAMA.* 2016; 315(15):1610-23. DOI: 10.1001/jama.2016.4218.
- Coltart C.E.M., Johnson A.M., Whitty C.J.M. Role of healthcare workers in early epidemic spread of Ebola: policy implication of prophylactic compared to reactive vaccination policy in outbreak prevention and control. *BMC Med.* 2015; 13:271. DOI: 10.1186/s12916-015-0477-2.

Authors:

Stovba L.F., Chukhraya O.V., Pavel'ev D.I., Chernikova N.K., Borisevich S.V. 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. 11, Oktyabrskaya St., Sergiev Posad-6, Moscow Region, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mail.ru.

Об авторах:

Стовба Л.Ф., Чухраля О.В., Павельев Д.И., Черникова Н.К., Борисевич С.В. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 141306, Московская обл., Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11. E-mail: 48cnii@mail.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-32-41

УДК 614.6:623.458

М.А. Юдин^{1,2}, А.С. Богачёва¹, А.Л. Бузмакова¹, А.В. Потапова¹, А.В. Романова¹,
Д.О. Калякина¹, В.В. Шилов¹

Исторические аспекты биотерроризма. Факторы, определяющие возможность использования патогенных биологических агентов в качестве биологического оружия

¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ²ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Обзор. С каждым годом стремительно растёт количество потенциально опасных для жизни патогенных биологических агентов (ПБА), которые представлены вирусами, бактериями, риккетсиями, хламидиями, простейшими, грибами, генно-инженерными конструкциями и модифицированными микроорганизмами, прионами и токсинами. Применение ПБА с целью разрушения общества, экономических ресурсов страны, ухудшения качества источников питания и водоснабжения, устрашения населения, провокаций внутренних беспорядков, дестабилизации государственного управления, создания экономического, социально-психического и экологического кризисов есть не что иное, как биологический терроризм. Разработанные и ратифицированные на сегодняшний день многочисленные международные соглашения, договоры и протоколы, ограничивающие производство и использование оружия массового поражения, не гарантируют ликвидацию рисков незаконного приобретения и использования ПБА террористическими организациями, что не позволяет исключить вероятность совершения актов биотерроризма. В связи с этим сохранение и укрепление административно-правовых, медико-биологических, санитарно-эпидемиологических, ветеринарно- и фитосанитарных и иных мероприятий должны составлять основу государственной политики Российской Федерации по противодействию применению и распространению ПБА.

Ключевые слова: патогенные биологические агенты, биологическое оружие, вирусы, биотерроризм, Конвенция о запрещении биологического оружия.

Корреспондирующий автор: Юдин Михаил Анатольевич, e-mail: mikhail.judin@gmail.com.

Для цитирования: Юдин М.А., Богачёва А.С., Бузмакова А.Л., Потапова А.В., Романова А.В., Калякина Д.О., Шилов В.В. Исторические аспекты биотерроризма. Факторы, определяющие возможность использования патогенных биологических агентов в качестве биологического оружия. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:32–41. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-32-41

Поступила 16.06.2022. Отправлена на доработку 26.09.2022. Принята к публ. 15.09.2023.

M.A. Yudin^{1,2}, A.S. Bogacheva¹, A.L. Buzmakova¹, A.V. Potapova¹, A.V. Romanova¹, D.O. Kalyakina¹,
V.V. Shilov¹

Historical Aspects of Bioterrorism: Factors Determining the Possibility of Using Pathogenic Biological Agents as Biological Weapons

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

²State Research Testing Institute of Military Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Review. Every year, the number of potentially life-threatening pathogenic biological agents (PBAs) is rapidly growing, which are represented by viruses, bacteria, rickettsia, chlamydia, protozoa, fungi, genetically engineered constructs and modified microorganisms, prions and toxins. The use of PBAs for the purpose of destroying society, the economic resources of the country, deteriorating the quality of food and water supplies, intimidating the population, provoking internal unrest, destabilizing government, and creating economic, socio-psychological and environmental crises is nothing more than biological terrorism. The numerous international agreements, treaties and protocols that have been developed and ratified to date, limiting the production and use of weapons of mass destruction, do not guarantee the elimination of the risks of illegal acquisition and use of biologically active substances by terrorist organizations, which does not exclude the possibility of committing acts of bioterrorism. In this regard, the preservation and strengthening of administrative-legal, medical-biological, sanitary-epidemiological, veterinary and phytosanitary and other measures should form the basis of the state policy of the Russian Federation to counter the use and spread of PBAs.

Key words: pathogenic biological agents, biological weapons, viruses, bioterrorism, Biological Weapons Convention.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Mikhail A. Yudin, e-mail: mikhail.judin@gmail.com.

Citation: Yudin M.A., Bogacheva A.S., Buzmakova A.L., Potapova A.V., Romanova A.V., Kalyakina D.O., Shilov V.V. Historical Aspects of Bioterrorism: Factors Determining the Possibility of Using Pathogenic Biological Agents as Biological Weapons. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:32–41. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-32-41

Received 16.06.2022. Revised 26.09.2022. Accepted 15.09.2023.

Yudin M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5646-0880>

Kalyakina D.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7142-0115>

На сегодняшний день напряженность геополитической обстановки в области национальной и межгосударственной безопасности все больше свидетельствует о необходимости ускорения технологического совершенствования и прорывных шагов в области здравоохранения и защиты населения от проявлений биотерроризма. В его основе стоит незаконное осуществление преднамеренного, сознательного и целенаправленного использования биологического оружия (БО) для устрашения или принуждения правительства, гражданского населения или любой части таковых для достижения политических или социальных целей. Несмотря на то, что большинство государств, включая Российскую Федерацию, придерживаются политики неиспользования и прекращения производства любого оружия массового поражения и постоянно увеличивают долю охранных и ограничительных мер, нельзя полностью исключить угрозу незаконного приобретения и использования патогенных биологических агентов (ПБА) террористическими организациями [1].

При рассмотрении сценариев умышленного применения ПБА биотерроризм различают от биопреступности. Во втором случае речь идет о сознательном использовании ПБА для заражения (убийства) человека или группы лиц, обусловленном корыстной или бескорыстной мотивацией. В качестве одного из эпизодов биопреступности можно привести случай заражения в 1996 г. *Shigella dysenteriae* выпечки, которую недовольный сотрудник больницы лаборатории преподнес в качестве угощения своим коллегам [2]. Биологический терроризм же, в отличие от преступности, ставит перед собой цели в виде разрушения общества, потери экономических ресурсов страны, лишения проживающих лиц источников питания и водообеспечения, устрашения населения, провокаций внутренних беспорядков, дестабилизации государственного управления, создания экономического, социально-психического и экологического кризисов. Зачастую лица, осуществляющие акты биотерроризма, вдохновлены идеологическими, религиозными или политическими убеждениями [3]. Успех попыток биотерроризма определяется степенью разрушения общества и паники и напрямую может не коррелировать с количеством жертв.

В современных условиях при ужесточении мероприятий, направленных на сохранение и укрепление биологического мониторинга в Российской Федерации и других странах, сохраняется прирост новых ПБА, представляющих угрозу жизни отдельно взятого человека, группы лиц, общества или населения, а также устоявшемуся миропорядку среди граждан и государственных институтов. В качестве ПБА рассматриваются микроорганизмы (вирусы, бактерии, риккетсии, хламидии, простейшие, грибы), генно-инженерные конструкции и модифицированные микроорганизмы, прионы, токсины, которые при использовании различных средств доставки могут вызывать массовые поражения людей, сельскохозяй-

ственных животных и посевов сельскохозяйственных культур [4]. К их особенностям относят продолжительное действие, скрытность распространения на огромные территории, образование микст-инфекций, длительность и сложность индикации, которые существенно снижают эффективность оказания медицинской помощи при высокой доле инфицированных лиц. ПБА, относящиеся к образцам БО, характеризуются низкой поражающей дозой и высокой контагиозностью, что в совокупности с непродолжительным скрытым периодом существенно увеличивает долю безвозвратных потерь или вероятность инвалидизации пораженных в результате развития последствий перенесенной инфекции (интоксикации).

Наиболее часто используемым в прошлом методом доставки ПБА считают распространение зараженных переносчиков: комаров, вшей, мух и других насекомых. Первые упоминания о массовом применении ПБА относят к 1346 г., когда войска Золотой Орды при осаде крепости в Феодосии для заражения ее жителей использовали трупы людей, погибших от чумы. Позднее чума распространилась по всей Европе и за пять лет привела к гибели 25 млн человек (около 5,5 % населения планеты) [5]. Позднее, в 1870 г., Луи Пастер осуществил попытки применения возбудителя холеры с целью снижения ущерба, наносимого винной промышленностью Франции многочисленным поголовьем кроликов [6].

Интенсификация исследований антропонозных инфекций происходит в 1950-х гг. и ознаменована испытаниями комаров *Aedes aegypti* – переносчиков вируса лихорадки денге (DENV) – на различных климатогеографических территориях проживания людей (Северная и Южная Америка, Африка) при их высвобождении из картонных коробок или сбрасывании с самолетов. Аналогичные исследования с москитами, инфицированными вирусом желтой лихорадки, проведены США в 1956 г. По результатам распространения этой инфекции в Саванне (штат Джорджия) и Эйвон-парке (штат Флорида) были получены исходные данные об особенностях формирования эпидемического очага [7].

На сегодняшний день для доставки москитов могут использоваться беспилотные летательные аппараты (БПЛА) [8]. Так, высвобождение из БПЛА популяций комаров с вектором, кодирующим активную область антитела 1C19 (single-chain variable fragment, scFv), а также комаров, инфицированных бактерией *Wolbachia*, снижающих репликацию вируса, позволяет эффективно бороться с развитием эпидемии DENV [9]. Вместе с тем практическая реализуемость применения БО и средств защиты от него через переносчиков сильно ограничена и зависит, с одной стороны, от жизненного цикла и устойчивости насекомого к окружающей среде, а с другой стороны, от активного перемещения зараженных насекомых [10].

В качестве примера биотерроризма, не связанного с использованием зараженных насекомых, не-

обходимо упомянуть факт преднамеренного заражения коренного народа Северной Америки (индейцев) возбудителем натуральной оспы [11]. Заслуживает внимания тот факт, что в этот же период (XVIII в.) в Великобритании содержимое пустул шкур зараженных коров используют для получения «вакцин» от натуральной оспы. Существенный прирост случаев применения ПБА как основы БО I поколения приходился на Первую мировую войну. При этом основным биообъектом поражения служили крупный рогатый скот и лошади. В качестве средств поражения использовались «традиционные агенты»: патогены и токсины микробного (эндо- и экзотоксины), растительного (фитотоксины) и животного (зоотоксины) происхождения. Так, в 1916 г. в посольство Германии была передана посылка с взрывчаткой и ампулами с живыми бактериями сапа и сибирской язвы, а через год поступило сообщение о нескольких задержаниях агентов немецких войск с образцами *Pseudomonas mallei*. Позднее стало известно о предотвращении теракта, в результате которого в г. Петрограде (Россия) предполагалось выпустить крыс, зараженных возбудителем чумы. Аналогичные эпизоды в период с 1915 по 1931 г. с установленным фактом или мотивом на диверсионное применение возбудителей сибирской язвы, сапа, чумы, ящура и холеры посредством взрыва были зафиксированы повсеместно как в Европе (Румыния, Болгария, Австрия, Греция, Испания, Италия), так и Америке (США, Аргентина) [12].

В связи с событиями Первой мировой войны возникла необходимость разработки конвенциональных запретов на использование БО для поражения живой силы противника. Реализацией этих договоренностей в результате многочисленных конференций и заключений экспертов при Лиге Наций послужило подписание 48 государствами Версальского мирного договора (1919 г.) и Женевского протокола (1925 г.).

Однако принятые меры не остановили широкомасштабные исследования и разработки потенциальных агентов БО. Так, в 1936 г. в Японии, которая не присоединилась к Женевскому протоколу, были созданы специальные лаборатории, известные как «Отряд 731» и «Отряд 100», занимавшиеся разработкой и оценкой ПБА и средств их применения. Практической реализацией этих разработок послужило распространение блох, зараженных чумой, вблизи г. Нинбо, что привело к развитию эпидемии в Китае. Позднее, вплоть до 1942 г., в регионах Чжэцзян, Цзянси, Юшань, Кинхва и Фуцин подтвержден факт заражения водоемов, полей и пищевых продуктов возбудителями холеры, брюшного тифа, дизентерии, паратифа и сибирской язвы, которые в совокупности с потерями от обычного оружия привели к массовой гибели мирных жителей (до 250 тыс. человек). Об опасности указанных ПБА также свидетельствовали данные высокой смертности (до 17 %) среди военнослужащих японской армии, применявших перечисленные ПБА [13].

В аналогичный период, начиная с 1937 г., Германия активно использует образцы БО для поражения живой силы противника. С 1941 по 1945 г. задокументированы свидетельства о проведении «истребляющих» экспериментов над узниками концентрационных лагерей Бухенвальд и Нацвейлер с применением возбудителя тифа. В последнем на заключенных также проводились исследования эпидемической желтухи [14].

Существенный прирост исследований ПБА отмечен в период с 1930 по 1970 г. Так, в 1932 г. в Турции на 600 добровольцах изучалась клиническая картина инфицирования бактериями *Treponema pallidum*, при этом сами испытуемые не знали об истинных мотивах исследования [15]. Аналогичные наблюдения на 400 испытуемых выполнялись в США в 1940 г., а в качестве патогена выступал *Plasmodium malariae*. В последнем случае клинические испытания также предусматривали оценку разрабатываемых средств лечения малярии [16]. Наиболее известный эпизод массового (1,5–5 тыс.) заражения жителей Гватемалы возбудителями сифилиса и гонореи, произошедший в период с 1946 по 1948 г., получил широкую огласку лишь в 2010 г. [17]. Несмотря на официальное осуждение факта проведения таких «экспериментов» Службой общественного здравоохранения, до настоящего времени США его не признали как преступление против человечности [18].

При разработке ПБА немаловажное внимание уделялось вопросам оценки их аэрозольных характеристик при использовании различных технических решений «адресной» доставки. Так, в период с 1950 по 1953 г., под эгидой установления степени уязвимости населения США к биологическим атакам, Военно-морские силы США осуществили распыление ПБА, предположительно *Bacillus subtilis* и *Serratia marcescens*, с кораблей вблизи Нью-Йорка и Сан-Франциско, а также предположительно *Bordetella pertussis* – над Тампа-Бей (штат Флорида). Расположенные в зоне распространения первичного облака ловушки аэрозоля, а также динамика развития клинических проявлений пневмонии у 800 тыс. жителей Сан-Франциско в течение первой недели позволили определить характер протекания инфекционного процесса в черте городской популяции, а также, исходя из расчетной экспозиционной дозы патогена, послужили исходными данными для запуска программы Germ Warfare Testing Program на ближайшие 20 лет [7]. В рамках этой программы огромное внимание уделялось вопросам рецептурирования потенциальных образцов БО за счет внесения в состав дополнительных веществ, увеличивающих жизнеспособность инфекционных агентов или устойчивость токсинов во внешней среде. Отдельным направлением служила разработка комбинированных рецептов, включающих два и более ПБА. Предполагается, что таким образом может обеспечиваться мимикрия заболеваний, что существенно усложнит проведение диагностических и лечебных мероприятий.

Одним из известных проектов, который посвящен скринингу более десятка тысяч потенциальных поражающих агентов, получивших нелегальное распространение в Европе и Азии, был MKSNICKWIT [19]. Именно с ним связывают разработки новых ПБА, в частности работы по изучению характеристик резервуарного накопления агентов у перелетных птиц, а также улучшению аэродинамических характеристик аэрозоля с помощью инхансеров. Косвенным подтверждением проводимых исследований служили данные об успешном распылении с самолетов или возгонке с земли в 1953 г. носителей на основе сульфида цинка и кадмия над Виннипегом, Сент-Луисом, Миннеаполисом, Форт-Уэйном (штат Мэриленд) и Лисбергом (штат Вирджиния) в рамках испытаний дымовых завес [20].

Вопрос, связанный с медико-тактической оценкой поражений, преимущественно новыми образцами ПБА, решался в проекте MKNAOMI (1950–1970-е гг.) [21]. В рамках него и при участии отдела специальных операций армейского центра биологических исследований Форт-Детрик (штат Мэриленд) США проводили исследования поражающего действия токсинов моллюсков, возбудителей стеблевой ржавчины пшеницы (*Puccinia graminis*, род *Tritici*), трихотецена (ниваленон, дезоксиниваленон и моноацетилниваленон (fusarenon-x), выделенных из *Fusarium nivale*. Так, в 1954 г. в США организовано масштабирование производства *Brucella suis* и *Francisella tularensis*, а в 1956 г. начались широко-масштабные исследования ПБА на добровольцах в рамках программы CD-22, контролирующая функция которой возложена на комиссию эпидемиологических наблюдений и эпидемиологический совет Вооруженных сил США [22]. В качестве одной из задач этой программы служила разработка вакцин к возбудителю туляремии.

С 1964 г. инициированы исследования бактерий стафилококковой группы, в частности стафилококкового энтеротоксина, представляющего собой короткодействующий агент, вызывающий жизнеугрожающие последствия. 1966 г. озаглавлен оценкой поражающего действия *Bacillus subtilis niger* при распылении возбудителя через систему вентиляции метро Нью-Йорка. Остаются неясными истинные мотивы изучения поражающего действия БПА грибковой природы на примере *Aspergillus fumigatus* в отношении лиц, обеспечивающих работу центра снабжения Военно-морских сил США вблизи Норфолка (штат Вирджиния). Примерно в этот же период выполнены исследования по созданию БПЛА для доставки различного рода боеприпасов к легкому стрелковому оружию, представленных капсулами с биологическими рецептурами для заражения людей, а также эксперименты по созданию биопленок для защиты возбудителя чумы от существующих на тот момент антибиотиков. Общее количество случаев с применением образцов ПБА в нескольких городах США составило 239 [7].

Эти обстоятельства, а также бесконтрольное накопление БО многими странами, и в первую очередь США, в послевоенный период с 1950-х по 1970-е гг. существенно подрывали стабильность миропорядка и угрожали гуманитарным институтам и ценностям. В связи с необходимостью международного контроля за вооружением в 1971 г. Генеральная Ассамблея ООН одобрила Конвенцию о запрещении разработки, производства и накопления запасов бактериологического (биологического) и токсинного оружия и об их уничтожении (КБТО), которая вступила в силу 26 марта 1975 г. На 2020 г. она ратифицирована 183 государствами [23].

Однако, несмотря на все достигнутые договоренности и постоянное увеличение доли стран – участниц КБТО, в США после 1970 г. продолжены исследования ПБА риккетсиозной природы, таких как *Coxiella burnetii*, вызывающей Ку-лихорадку, и вирусов семейства *Togaviridae* (род *Alphavirus*) и *Flaviviridae* (род *Flavivirus*), вызывающих восточный и венесуэльский энцефалит лошадей и желтую лихорадку соответственно. Для большинства из них были получены высокоочищенные стандарты, которые испытывались на добровольцах в проектах 112 и SHAD [24]. Образцы, удовлетворяющие заданным требованиям, подвергались промышленной обработке с последующим размещением на кораблях и самолетах. Именно в этот период происходит переоценка направлений исследований с приоритетом на создание БО II поколения, в составе которого генетически модифицированные представители известных ПБА с более высокой эффективностью и способностью преодолевать меры медицинской защиты. Так, уже с 1969 г. в США прорабатывался широко-масштабный проект по изучению возможностей создания генетических и генно-модифицированных агентов. Инициированные позднее работы в Форд-Детрике предусматривали создание аналогов ретровирусов (HIV-1 и HIV-2) и генетического оружия, специфично воздействующих на этнические группы и расовые представительства (PROJECT 15090) [25]. Параллельно им выполнялись исследования по получению синтетических аналогов токсинов (предположительно сакситоксина и тетродотоксина), обладающих низкой иммуногенной активностью, что серьезным образом затрудняло бы разработку эффективных мер медицинской защиты иммунобиологическими препаратами на основе вакцин и анатоксинов.

После реформирования центра изучения БО и образования на его основе Национального института изучения канцерогенеза (NCI) специалистами из США инициированы работы по изучению вертикального и горизонтального вирусного канцерогенеза. Одним из первых открытий этой организации стало описание вируса Т-клеточной лейкемии человека (HTLV), который не распознается иммунной системой человека. Не менее смертельную угрозу для всего человечества и предмет биотерроризма стал

представлять синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), вызванный вирусом HIV и впервые выявленный в 1981 г. у гомосексуалистов Нью-Йорка, Лос-Анжелеса и Сан-Франциско. Согласно расшифрованной последовательности консервативного участка указанный вирус имел сходство с лимфотропным ретровирусом HTLV и VISNA овец [26]. До сегодняшнего дня в отсутствие эффективных средств медицинской защиты HIV остается серьезной угрозой в качестве инструмента для совершения актов биологического терроризма.

С 1986 г. на основании данных отчета Конгресса США перечень ПБА дополнен модифицированными вирусами, токсинами природного происхождения и агентами с измененной структурой методами биотехнологии. В основании для внесения дополнений лежал принцип «нераспознавания» иммунной системой человека чужеродных агентов, а также неспособность существующих вакцин и антитоксинов эффективно им противостоять. Позднее Министерство обороны США открыто заявило о существовании целой сети из 127 институтов, занятых работами с ПБА, а John D. Rockefeller сообщил о более чем полувексовых испытаниях различных образцов ПБА и средств защиты от них на добровольцах и лицах без их личного согласия [21, 22]. Так, в 1994 г. появляется сообщение Dr Garth Nicolson об инфицировании большинства ветеранов операции «Буря в пустыне» измененным штаммом *Mycoplasma incognitus*. За счет наличия в его оболочке до 40 % спайкового белка вируса HIV данный агент обеспечивал себе защиту от распознавания иммунной системой человека [27]. Позднее указан источник происхождения ПБА, использованных во время войны в Персидском заливе (Хьюстон, штат Техас, и Бока-Ратон, штат Флорида) [28]. Наиболее значимые случаи биотерроризма, получившие широкую огласку, приведены в табл. 1.

В 1984 г. в Те-Далсе (штат Орегон, США) в результате преднамеренного обсеменения заправки для салатов *Salmonella enterica Typhimurium* постра-

дал 751 человек, 45 из которых госпитализированы. Исполнителями этой акции были последователи религиозного движения Раджниша, а целевой установкой их действиям служило вмешательство в местные выборы [29].

В 1990 г. террористической организацией «Аум синрикё» предпринято несколько попыток применения ботулотоксина в отношении парламентариев и королевского окружения на свадьбе японского принца. Другим примером применения БО токсинной природы служит использование в 1991 г. рицина правым крылом политического «патриотического» движения (штат Миннесота, США) Minnesota Patriots Council в отношении специалистов Налоговой службы (IRS – Internal Revenue Service) и официальных лиц США. Предполагается, что почтовые отправления были обработаны аэрозолем рицина или покрыты пленкой, содержащей токсин – диметилсульфоксид [30].

Позднее, в 1993 г., члены секты «Аум синрикё» распылили споры *Bacillus anthracis* с крыши здания в Токио [31]. Аналогичные случаи биотерроризма задокументированы в США, где в сентябре 2001 г. письма, зараженные *Bacillus anthracis*, были направлены в несколько офисов средств массовой информации и двум сенаторам от Демократической партии США [32].

С начала 1990-х гг. в обход КБТО начинает разрабатываться БО III поколения, представляющее собой усовершенствованные агенты, которые не встречаются или не встречались (после вспышки или эпидемии) ранее в природе, их разработка основывается на уязвимости определенных звеньев иммунной системы человека [33]. Они получены с помощью методов генной инженерии, характеризуются скрытностью использования, наличием латентного периода, массовым поражающим действием, атипичным течением и отсутствием специфических симптомов развивающейся инфекции, а также тест-систем и средств лечения (табл. 2).

Существенное внимание исследованиям новых ПБА, которые потенциально могут быть вклю-

Таблица 1 / Table 1

Наиболее значимые случаи биологического терроризма
The most significant cases of biological terrorism

Год события Year of the event	Место, страна Location, country	Агент Pathogenic agent	Количество пораженных Number of people affected
1984	Те-Далс, штат Орегон, США Te-Dahls, Oregon, USA	Сальмонелла Salmonella	751 пострадавший 751 affected
1990	Токио, Япония Tokyo, Japan	Ботулотоксин Botulinum toxin	Нет пострадавших No affected
1991	Миннесота, США Minnesota, USA	Рицин Ricin	Точные сведения отсутствуют No accurate data available
1993	Токио, Япония Tokyo, Japan	Сибирская язва Anthrax	Нет пострадавших No affected
2001	Вашингтон, Нью-Йорк, США Washington, New York, USA	Сибирская язва Anthrax	5 погибших, 17 пострадавших 5 dead, 17 affected

Таблица 2 / Table 2

Медико-тактические характеристики различных поколений биологического оружия [34]

Medical and tactical characteristics of various generations of biological weapons (BW) [34]

Характеристики Characteristics	Поколения БО BW generations		
	I	II	III
Поражающая доза, г Harmful dose, g	10^{-12}	10^{-16}	10^{-16}
Скрытый период Latent period	Дни – недели Days – weeks	Дни – недели Days – weeks	Часы – дни Hours – days
Летальность, % Lethality, %	До 50 Up to 50	До 80 Up to 80	До 80 Up to 80
Утрата боеспособности Loss of combat capability	Дни – недели Days – weeks	Дни – недели Days – weeks	Часы – годы Hours – years
Популяционно-клеточная избирательность действия Population-cellular selectivity of action	Низкая Low	Низкая Low	Высокая High
Способность к антигенной мимикрии Capacity for antigenic mimicry	Есть Present	Есть Present	Снижена Decreased
Вероятность вертикальной передачи Probability of vertical transmission	Нет No	Нет No	Есть Present
Возможность индикации Possibility of indication	Есть Present	Есть Present	Снижена Low
Наличие специфических тест-систем Availability of test-systems	Есть Available	Есть Available	Нет Not available
Симптомы развивающейся инфекции Symptoms of developing infection	Типичные Typical	Как правило, типичные As a rule, typical	Атипичные Atypical
Отдаленные последствия Delayed, long-term consequences	Нет No	Нет No	Есть Present
Медицинские средства защиты Medical protective means	Есть Available	Малоэффективны Of little effect	Нет Not available

чены в состав БО III поколения, с одной стороны, диктуется усилением институтов власти, обеспечивающих контрольно-надзорную функцию за научно-исследовательскими организациями, с другой стороны, может служить объяснением отказа США в 2001 г. принять обязательства по взаимному контролю выполнения КБТО. Так, в конце 1990-х гг. в США создан Национальный научный консультативный совет по биобезопасности (NSABB) для мониторинга потенциальных исследований двойного назначения, а при Министерстве обороны США запущена программа по трансформационным медицинским технологиям (TNTI), которая предполагает секвенирование генома ПБА, рассматриваемых в качестве основы биотерроризма, с целью разработки универсальных мер защиты. Итогом проводимых работ за рубежом за последние 20 лет стало создание множества платформ по доставке генетического материала в биологическую матрицу, преимущественно за счет вирусных векторов (табл. 3).

Наибольшую угрозу при сочетании неблагоприятных факторов инфекционного процесса (восприимчивость макро- и патогенность микроорганизма при наличии механизма передачи) представляют вирусы, передаваемые воздушно-капельным путем (ретровирусные, аденовирусные, лентивирусные и

аденоассоциированные векторы). Наибольшей емкостью по ДНК обладают векторы-ампликоны на основе вируса герпеса простого (до 150 т.п.о.), тогда как наименьшей (до 4 т.п.о.) – векторы на основе аденоассоциированного вируса [35]. Эти особенности, а также способность перенацеливать векторы на разные типы клеток или участки генома человека (например, векторы на основе HIV) создают условия для реализации их онкогенного потенциала.

Весомая угроза мировой безопасности также сопряжена с высоким риском получения неконтролируемыми группировками, включая террористические организации, доступа к государственным коллекциям культур или аналитическим стандартам БО. Простота и доступность получения векторов с заданными свойствами с использованием коммерчески доступных наборов (Takara, ThermoFisher Scientific, GeneCopia, Systems Biosciences, Agilent Technologies) также подкрепляют возросшие риски по наработке необходимого количества образцов для применения в террористических целях. Необходимо отметить, что появление новых ПБА, представляющих угрозу жизни людей, усиливалось на фоне снижения уровня контроля международных организаций за профилактикой инцидентов с использованием ПБА в террористических целях [36]. Отчасти это

Таблица 3 / Table 3

Сравнительная характеристика доставки генетического материала с помощью вирусных векторов

Comparative characteristics of the delivery of genetic material using viral vectors

Наименование семейства вируса (вируса) Name of the virus family (virus)	Путь доставки Delivery route	Преимущества Advantages	Ограничения Limitations
Ретровирусные Retrovirus	Ингаляционный Inhalation	Высокая эффективность, продолжительная экспрессия, тропность к эпителию дыхательных путей, низкая иммуногенность, емкость 7–7,5 т.п.о., интеграция в геном High efficiency, long-lasting expression, tropism for the respiratory tract epithelium, low immunogenicity, capacity of 7–7.5 kb, integration into the genome	Инсерционный мутагенез, неспособность к трансфекции в ткани мышц, мозга, легких и печени Insertional mutagenesis, failure to transfect into muscle, brain, lung and liver tissues
Аденовирусные Adenovirus	Ингаляционный, инъекционный Inhalation, injection	Трансфекция различных органов (легкие, печень, почки, эпителий ЖКТ, мышцы), кратковременная экспрессия, простота наработки, емкость 30 т.п.о. Transfection of various organs (lungs, liver, kidneys, gastrointestinal epithelium, muscles), short-term expression, ease of reproduction, capacity of 30 kb	Высокая иммуногенность по причине наличия у реципиента иммунитета, неспособность к интеграции в геном High immunogenicity due to the presence of immunity in the recipient, inability to integrate into the genome
Лентивирусные Lentivirus	Ингаляционный, инъекционный Inhalation, injection	Высокая эффективность, продолжительная экспрессия, возможность псевдотипирования для придания тропности к различным тканям, низкая иммуногенность, интеграция в геном, емкость 7–7,5 т.п.о. High efficiency, long-lasting expression, possibility of pseudotyping to impart tropism to various tissues, low immunogenicity, integration into the genome, capacity of 7–7.5 kb	Инсерционный мутагенез, сложность в наработке Insertion mutagenesis, difficulty in reproduction
Аденоассоциированные Adeno-associated	Ингаляционный, инъекционный Inhalation, injection	Трансфекция в различные типы клеток, медленное начало и длительная экспрессия, интеграция в геном, емкость 3,5–4,0 т.п.о. Transfection into various cell types, slow onset and long-lasting expression, genome integration, 3.5–4.0 kb capacity	Высокая иммуногенность, сложность в наработке High immunogenicity, difficulty in reproduction
Вирус простого герпеса Herpes simplex virus	Инъекционный Injection	Низкая токсичность, высокая емкость – 150 т.п.о., длительность экспрессии – до 1 года Low toxicity, high capacity of 150 kb, expression duration – up to 1 year	Снижение иммунитета, высокая вероятность наличия у реципиента иммунитета, сложная технология получения ампликонов Decreased immunity, high probability of the recipient having immunity, complex technology for obtaining amplicons
Ортопоксвирусы Orthopoxviruses	Инъекционный Injection	Высокая эффективность доставки в ткань опухолей, емкость 25 т.п.о., возможность инфицировать различные ткани человека, не вызывая патологических процессов High efficiency of delivery to tumor tissue, capacity of 25 kb, ability to infect various human tissues without causing pathological processes	Сложный процесс наработки Complex process of reproduction

Примечание: т.п.о. – тысяч пар оснований.

Note: kb– Kilobase pairs.

связано как с расширением спектра потенциальных ПБА, не попадающих под действие КБТО, так и с попыткой переоценить роль и место отдельных миссионеров по расширению полномочий в праве установления виновных, например, как это было в отношении химических атак (правительство Сирийской Арабской Республики) или пандемии COVID-19 (руководство Китая). Нельзя однозначно утверждать об эффективности работы неформальной австралийской группы (IOBC-WPRS), которая с 1995 г. осуществляет мониторинг и лицензирование экспорта химических веществ, биологических агентов с целью предотвращения распространения материалов двойного назначения [37]. Осуждения любых форм

терроризма в течение последнего десятилетия неоднократно озвучивались на Совете Безопасности ООН, а в 2001 г. согласно Резолюции 1373 была признана связь международного терроризма и перевозки ядерных, химических и биологических материалов.

Совершенствование вирусных векторов и широкое внедрение их в научную и медицинскую практику могло лежать в основе эпидемий XXI в., вызванных SARS-CoV: тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС) (с 2002 г.), H1N1 – «свиной грипп» (с 2009 г.), H7N9 – «грипп птиц» (2013 г.), *Poliovirus hominis* – «полиомиелит» (с 2014 г.) и EBOV – «лихорадка Эбола». В отношении пандемии COVID-19 существует мнение об искусственном происхождении

ее возбудителя SARS-CoV-2, что позволяет отнести подобные сценарии бесконтрольного распространения ПБА к актам биотерроризма [38, 39].

С широким внедрением интернет-ресурсов существенно возросла вероятность приобретения и сбыта прекурсоров и образцов БО, а также политизация напряженности в связи с якобы имевшими место случаями применения различных агентов, которые послужили причиной массовых случаев заболевания среди населения. Это должно учитываться при организации доведения до потребителя достоверной информации и выстраивании алгоритмов социальной, противоэпидемической и медицинской защиты населения, проживающего в зоне природно-очаговых болезней.

На сегодняшний день приняты очередные шаги по усилению мер контроля за потенциальными ПБА, которые могут рассматриваться в качестве образцов БО. В частности, в ходе очередного саммита G8 (G7 в настоящее время) в 2020 г. было объявлено усиление глобального партнерства с целью предотвращения попадания ядерного, биологического или химического оружия в руки террористов или враждебных государств [40]; ВОЗ уполномочена в части мониторинга распространения опасных инфекционных заболеваний, установления их этиологии и причин появления [41]; создана Международная морская организация, а также организована работа таможенной организации по отслеживанию перевозимых грузов.

Однако ратифицированные на сегодняшний день конвенциональные соглашения, а также государственные институты и межгосударственные органы, наделенные отдельными полномочиями, не предусматривают единой системы противодействия новым биологическим угрозам, а также распространению биотерроризма, всеобъемлющего контроля за созданием и применением ПБА.

Таким образом, разработка единой системы противодействия распространению биотерроризма является одной из приоритетных задач международного сотрудничества в области обеспечения биологической безопасности, а ее практическая реализация может быть возложена на ВОЗ при мониторинговой миссии ООН.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Топорков А.В., Липницкий А.В., Викторов Д.В. Проблемы противодействия биологическому терроризму на современном этапе. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2016; 1:24–31.
2. O'Brien S., Garvey P., Baker K., Brennan M., Cormican M., Cuddihy J., De Lappe N., Ellard R., Fallon U., Irvine N., Murphy S., O'Brien D., O'Connor M., O'Hare C., O'Sullivan M.B., Part A.M., Rooney P., Ryan A., Waldron G., Ward M., McKeown P.J.; Outbreak Control Team. Investigation of a foodborne outbreak of *Shigella sonnei* in Ireland and Northern Ireland, December 2016: the benefits of

- cross-border collaboration and commercial sales data. *Public Health*. 2020; 182:19–25. DOI: 10.1016/j.puhe.2020.01.008.
3. Jansen H.J., Breeveld F.J., Stijnis C., Grobusch M.P. Biological warfare, bioterrorism and biocrime. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20(6):488–96. DOI: 10.1111/1469-0691.12699.
4. Mansour B.M., Alsuleman D.M., Alghanem S.H. An overview of biological warfare and SARS-CoV-2 as a potential biological agent. *World Family Medicine*. 2022; 20(3):43–51. DOI: 10.5742/MEWFM.2022.9525010.
5. Хайдаров Т.Ф. Эпоха «Черной смерти» в Золотой Орде и прилегающих регионах (конец XIII – первая половина XV вв.). Казань: Институт истории им. Ш. Марджани АН РТ; 2018. 304 с.
6. Михель Д.В. Общественное здоровье и холерный вибрион: Российская империя, медицина и бактериология начала XX века перед угрозой холеры. *Известия Саратовского университета*. 2008; 8(2):64–74.
7. Biological Testing Involving Human Subjects by the Department of Defense, 1977: Hearings before the Subcommittee on Health and Scientific Research of the Committee on Human Resources, United States Senate. Washington: U.S. Government printed office; 1977. 297 p.
8. Calvert S.M. Toxic Mosquito Aerial Release System. Patent US. No. 8967029B1, date of publ. 2015-03-03.
9. Buchman A., Gamez S., Li M., Antoshechkin I., Li H.H., Wang H.W., Chen C.H., Klein M.J., Duchemin J.B., Crowe J.E. Jr, Paradkar P.N., Akbari O.S. Broad dengue neutralization in mosquitoes expressing an engineered antibody. *PLoS Pathog.* 2020; 16(1):e1008103. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008103.
10. Биологическая безопасность (биологическое оружие и биотерроризм). СПб.: ПИЦ ПСПбГМУ; 2018. 67 с.
11. d'Errico P. Jeffrey Amherst and smallpox blankets: Lord Jeffrey Amherst's letters discussing germ warfare against American Indians. 2020; 11 p. DOI: 10.13140/RG.2.2.23231.66724.
12. Супотницкий М.В. Биологическая война. Введение в эпидемиологию искусственных эпидемических процессов и биологических поражений: монография. М.: Кафедра: Русская панорама; 2013. 1136 с.
13. Chevrier M.L., Chomiczewski K., Garrigue H., Granasztói G., Dando M.R., Pearson G.S., editors. The Implementation of Legally Binding Measures to Strengthen the Biological and Toxin Weapons Convention. NATO Science Series. Kluwer Academic Publisher; 2004. 299 p.
14. Кобец П.Н. О важности разработки комплексных мер, наиболее эффективно противодействующих угрозам биотерроризма. *Философия права*. 2021; 1:75–80.
15. Alsan M., Wanamaker M. Tuskegee and the health of black men. National Bureau of Economic Research (NBER); 2017. Working paper 22323. 51 p. DOI: 10.3386/w22323.
16. McKenzie F.E., Smith D.L., O'Meara W.P., Riley E.M. Strain theory of malaria: the first 50 years. *Adv. Parasitol.* 2008; 66:1–46. DOI: 10.1016/S0065-308X(08)00201-7.
17. Ford J.S. Systemic medical racism: the reconstruction of whiteness through the destruction of black bodies. *Honors College Theses*. 2019. [Электронный ресурс]. URL: <https://digitalcommons.georgiasouthern.edu/honors-theses/403>.
18. Fox M. U.S. apologies for syphilis experiment in Guatemala. *Reuters. Healthcare and Pharma*. 01.10.2010. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.reuters.com/article/us-usa-guatemalalexperiment-idUSTRE6903RZ20101001>.
19. Chemical Concussions and Secret LSD: Pentagon Details Cold War Mind-Control Tests. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.wired.com/2010/05/chemical-concussions-and-secret-lsd-military-releases-cold-war-mind-control-report/> (дата обращения 01.08.2021).
20. Cole L.A. The Eleventh Plague: the politics of Biological and Chemical Warfare. Henry Holt and Company; 1996. 304 p.
21. Gillmor D. I Swear by Apollo: Dr. Ewen Cameron and the CIA-brainwashing Experiments. Montreal: Eden Press; 1987. 165 p.
22. Thomas G. Journey into Madness. The True Story of Secret CIA Mind Control and Medical Abuse. New York: Bantam; 1989. 388 p.
23. Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on Their Destruction. [Электронный ресурс]. URL: <https://treaties.unoda.org/t/bwc> (дата обращения 15.11.2022).
24. The Department of Defense's Inquiry into Project 112/ Shipboard Hazard and Defense (SHAD) Test. Committee on Armed Services, United States Senate. 2002. 164 p.
25. Legacy of the Trans-Atlantic Slave Trade: Hearing before the Subcommittee on the Constitution, Civil Rights, and Civil Liberties of the Committee on the Judiciary House of Representatives. Authenticated U.S. Government Information; 2007. Serial No. 110-63. 336 p.
26. Alencar S.P., Souza M.C., Fonseca R.R.S., Menezes C.R., Azevedo V.N., Ribeiro A.L.R., Lima S.S., Laurentino R.V., Barbosa M.D.A.A.P., Freitas F.B., Oliveira-Filho A.B., Machado L.F.A.

Prevalence and molecular epidemiology of human T-lymphotropic virus (HTLV) infection in people living with HIV/AIDS in the Pará State, Amazon Region of Brazil. *Front. Microbiol.* 2020; 11:572381. DOI: 10.3389/fmicb.2020.572381.

27. Nijs J., Coomans D., Nicolson G.L., De Becker P., Christian D., De Meirlier K. Immunophenotyping predictive of Mycoplasma infection in patients with chronic fatigue syndrome? *J. Chronic Fatigue Syndr.* 2003; 11(2):51–70. DOI: 10.1300/J092v11n02_05.

28. Lo S.C., Levin L., Ribas J., Chung R., Wang R.Y., Wear D., Shih J.W. Lack of serological evidence for *Mycoplasma fermentans* infection in army Gulf War veterans: a large scale case-control study. *Epidemiol. Infect.* 2000; 125(3):609–16. DOI: 10.1017/s0950268800004891.

29. Dailey A., Saha J., Zaidi F., Abdirahman H., Haymond A., Alem F., Hakami R., Couch R. VOC fingerprints: metabolomic signatures of biothreat agents with and without antibiotic resistance. *Sci. Rep.* 2020; 10(1):11746. DOI: 10.1038/s41598-020-68622-x.

30. Tucker J.B., Pate J. The Minnesota Patriots Council (1991). In: Tucker J.B., editor. Toxic Terror: Assessing Terrorist Use of Chemical and Biological Weapons. MIT Press, Cambridge, MA; 2000. P. 159–83.

31. Indić D.R., Rutic S.Z., Ivanković N.D. Modeling international nuclear chemical biological defence forces in case of chemical weapons application for terrorist purposes. *Military Technical Courier.* 2016; 64(4):987–1008. DOI: 10.5937/vojtehg64-10402.

32. Anthrax. In a Time of Terror [Электронный ресурс]. URL: <https://postalmuseum.si.edu/exhibition/behind-the-badge-case-histories-dangerous-mail/anthrax> (дата обращения 17.03.2022).

33. Андрюков Б.Г., Беседнова Н.Н., Калинин А.В., Котельников В.Н., Крыжановский С.П., Хотимченко Ю.С. Биологическое оружие и глобальная система биологической безопасности. Практическое руководство. Владивосток: Дальнаука; 2017. 448 с. DOI: 10.5281/zenodo.849731.

34. Chemical and Bacteriological (Biological) Weapons and the Effects of Their Possible Use. New York: Balantine books, Inc.; 1970. United Nations Report No. E. 69, I, 24. 178 p.

35. Супотницкий М.В. Генотерапевтические векторные системы на основе вирусов. *Биопрепараты.* 2011; 3:15–26.

36. Tin D., Sabeti P., Ciotone G.R. Bioterrorism: An analysis of biological agents used in terrorist events. *Am. J. Emerg. Med.* 2022; 54:117–21. DOI: 10.1016/j.ajem.2022.01.056.

37. Australia Group Common Control List Handbook. Volume II: Biological Weapons-Related Common Control Lists. 2018.

38. Armengaud J. The proteomics contribution to the counter-bioterrorism toolbox in the post-COVID-19 era. *Expert Rev. Proteomics.* 2020; 17(7-8):507–11. DOI: 10.1080/14789450.2020.1822745.

39. Sachs J.D., Karim S.S.A., Akin L., Allen J., Brosbøl K., Colombo F., Barron G.C., Espinosa M.F., Gaspar V., Gaviria A., Haines A., Hotez P.J., Koundouri P., Basculán F.L., Lee J.K., Pate M.A., Ramos G., Reddy K.S., Serageldin I., Thwaites J., Vike-Freiberga V., Wang C., Were M.K., Xue L., Bahadur C., Bottazzi M.E., Bullen C., Laryea-Adjei G., Amor Y.B., Karadag O., Lafortune G., Torres E., Barredo L., Bartels J.G.E., Joshi N., Hellard M., Huynh U.K., Khandelwal S., Lazarus J.V., Michie S. The Lancet Commission on lessons for the future from the COVID-19 pandemic. *Lancet.* 2022; 400(10359):1224–80. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01585-9.

40. Kemp L., Rhodes C. The Cartography of Global Catastrophic Governance. Global Challenges Foundation. 2020.

41. WHO. Biological weapons [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/health-topics/biological-weapons#tab=tab_2 (дата обращения 19.04.2022).

References

1. Onishchenko G.G., Toporkov A.V., Lipnitsky A.V., Viktorov D.V. [Problems of countering biological terrorism at the present stage]. *Infektsionnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2016; (1):24–31.

2. O'Brien S., Garvey P., Baker K., Brennan M., Cormican M., Cuddihy J., De Lappe N., Ellard R., Fallon U., Irvine N., Murphy S., O'Brien D., O'Connor M., O'Hare C., O'Sullivan M.B., Part A.M., Rooney P., Ryan A., Waldron G., Ward M., McKeown P.J.; Outbreak Control Team. Investigation of a foodborne outbreak of *Shigella sonnei* in Ireland and Northern Ireland, December 2016: the benefits of cross-border collaboration and commercial sales data. *Public Health.* 2020; 182:19–25. DOI: 10.1016/j.puhe.2020.01.008.

3. Jansen H.J., Breeveld F.J., Stijns C., Grobusch M.P. Biological warfare, bioterrorism and biocrime. *Clin. Microbial. Infect.* 2014; 20(6):488–96. DOI: 10.1111/1469-0691.12699.

4. Mansour B.M., Alsuleman D.M., Alghanem S.H. An overview of biological warfare and SARS-CoV-2 as a potential biological agent. *World Family Medicine.* 2022; 20(3):43–51. DOI: 10.5742/MEWFM.2022.9525010.

5. Khaidarov T.F. [The Era of the “Black Death” in the Golden Horde and Surrounding Regions (Late XIII – First Half of the

XV Centuries)]. Kazan: Institute of History named after Sh. Marjani, Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan; 2018. 304 p.

6. Mikheľ D.V. [Public health and *Vibrio cholerae*: Russian Empire, medicine and bacteriology of the early 20th century facing the threat of cholera]. *Izvestiya Saratovskogo Universiteta [Bulletin of the Saratov University]*. 2008; 8(2):64–74.

7. Biological Testing Involving Human Subjects by the Department of Defense, 1977: Hearings before the Subcommittee on Health and Scientific Research of the Committee on Human Resources, United States Senate. Washington: U.S. Government printed office; 1977. 297 p.

8. Calvert S.M. Toxic Mosquito Aerial Release System. Patent US. No. 8967029B1, date of publ. 2015-03-03.

9. Buchman A., Gamez S., Li M., Antoshechkin I., Li H.H., Wang H.W., Chen C.H., Klein M.J., Duchemin J.B., Crowe J.E. Jr, Paradkar P.N., Akbari O.S. Broad dengue neutralization in mosquitoes expressing an engineered antibody. *PLoS Pathog.* 2020; 16(1):e1008103. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008103.

10. [Biological Security (Biological Weapons and Bioterrorism)]. St. Petersburg; 2018. 67 p.

11. d'Errico P. Jeffrey Amherst and smallpox blankets: Lord Jeffrey Amherst's letters discussing germ warfare against American Indians. 2020; 11 p. DOI: 10.13140/RG.2.2.23231.66724.

12. Supotnitsky M.V. [Biological Warfare. Introduction to the Epidemiology of Artificial Epidemic Processes and Biological Lesions. Monograph]. M.: Department: Russian Panorama; 2013. 1136 p.

13. Chevrier M.I., Chomiczewski K., Garrigue H., Granasztói G., Dando M.R., Pearson G.S., editors. The Implementation of Legally Binding Measures to Strengthen the Biological and Toxin Weapons Convention. NATO Science Series. Kluwer Academic Publisher; 2004. 299 p.

14. Kobets P.N. [On the importance of developing comprehensive measures that most effectively counter the threats of bioterrorism]. *Filosofiya Prava [Philosophy of Law]*. 2021; (1):75–80.

15. Alsan M., Wanamaker M. Tuskegee and the health of black men. National Bureau of Economic Research (NBER); 2017. Working paper 22323. 51 p. DOI: 10.3386/w22323.

16. McKenzie F.E., Smith D.L., O'Meara W.P., Riley E.M. Strain theory of malaria: the first 50 years. *Adv. Parasitol.* 2008; 66:1–46. DOI: 10.1016/S0065-308X(08)00201-7.

17. Ford J.S. Systemic medical racism: the reconstruction of whiteness through the destruction of black bodies. *Honors College Theses.* 2019. [Internet]. Available from: <https://digitalcommons.georgiasouthern.edu/honors-theses/403>.

18. Fox M. U.S. apologies for syphilis experiment in Guatemala. Reuters. *Healthcare and Pharma.* 01.10.2010. [Internet]. Available from: <https://www.reuters.com/article/us-usa-guatemala-experiment-idUSTRE6903RZ20101001>.

19. Chemical Concussions and Secret LSD: Pentagon Details Cold War Mind-Control Tests. (Cited 01 Aug 2021). [Internet]. Available from: <https://www.wired.com/2010/05/chemical-concussions-and-secret-lsd-military-releases-cold-war-mind-control-report>.

20. Cole L.A. The Eleventh Plague: the politics of Biological and Chemical Warfare. Henry Holt and Company; 1996. 304 p.

21. Gillmor D. I Swear by Apollo: Dr. Ewen Cameron and the CIA-brainwashing Experiments. Montreal: Eden Press; 1987. 165 p.

22. Thomas G. Journey into Madness. The True Story of Secret CIA Mind Control and Medical Abuse. New York: Bantam; 1989. 388 p.

23. Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on Their Destruction. (Cited 15 Nov 2022). [Internet]. Available from: <https://treaties.unoda.org/t/bwc>.

24. The Department of Defense's Inquiry into Project 112/Shipboard Hazard and Defense (SHAD) Test. Committee on Armed Services, United States Senate. 2002. 164 p.

25. Legacy of the Trans-Atlantic Slave Trade: Hearing before the Subcommittee on the Constitution, Civil Rights, and Civil Liberties of the Committee on the Judiciary House of Representatives. Authenticated U.S. Government Information; 2007. Serial No. 110-63. 336 p.

26. Alencar S.P., Souza M.C., Fonseca R.R.S., Menezes C.R., Azevedo V.N., Ribeiro A.L.R., Lima S.S., Laurentino R.V., Barbosa M.D.A.A.P., Freitas F.B., Oliveira-Filho A.B., Machado L.F.A. Prevalence and molecular epidemiology of human T-lymphotropic virus (HTLV) infection in people living with HIV/AIDS in the Pará State, Amazon Region of Brazil. *Front. Microbiol.* 2020; 11:572381. DOI: 10.3389/fmicb.2020.572381.

27. Nijs J., Coomans D., Nicolson G.L., De Becker P., Christian D., De Meirlier K. Immunophenotyping predictive of Mycoplasma infection in patients with chronic fatigue syndrome? *J. Chronic Fatigue Syndr.* 2003; 11(2):51–70. DOI: 10.1300/J092v11n02_05.

28. Lo S.C., Levin L., Ribas J., Chung R., Wang R.Y., Wear D., Shih J.W. Lack of serological evidence for *Mycoplasma fermentans* infection in army Gulf War veterans: a large scale case-control study. *Epidemiol. Infect.* 2000; 125(3):609–16. DOI: 10.1017/s0950268800004891.

29. Dailey A., Saha J., Zaidi F., Abdirahman H., Haymond A., Alem F., Hakami R., Couch R. VOC fingerprints: metabolomic signatures of biothreat agents with and without antibiotic resistance. *Sci. Rep.* 2020; 10(1):11746. DOI: 10.1038/s41598-020-68622-x.
30. Tucker J.B., Pate J. The Minnesota Patriots Council (1991). In: Tucker J.B., editor. *Toxic Terror: Assessing Terrorist Use of Chemical and Biological Weapons*. MIT Press, Cambridge, MA; 2000. P. 159–83.
31. Indić D.R., Rutic S.Z., Ivanković N.D. Modeling international nuclear chemical biological defence forces in case of chemical weapons application for terrorist purposes. *Military Technical Courier*. 2016; 64(4):987–1008. DOI: 10.5937/vojtehg64-10402.
32. Anthrax. In a Time of Terror. (Cited 17 Mar 2022). [Internet]. Available from: <https://postalmuseum.si.edu/exhibition/behind-the-badge-case-histories-dangerous-mail/anthrax>.
33. Andryukov B.G., Besednova N.N., Kalinin A.V., Kotelnikov V.N., Kryzhanovsky S.P., Khotimchenko Yu.S. [Biological Weapons and the Global Biosecurity System. Practice Guidelines]. Vladivostok: "Dalnauka"; 2017. 448 p. DOI: 10.5281/zenodo.849731.
34. Chemical and Bacteriological (Biological) Weapons and the Effects of Their Possible Use. New York: Balantine books, Inc.; 1970. United Nations Report No. E. 69, I, 24. 178 p.
35. Supotnitsky M.V. [Virus-based gene therapy vector systems]. *Biopreparaty [Biological Products]*. 2011; (3):15–26.
36. Tin D., Sabeti P., Ciottoni G.R. Bioterrorism: An analysis of biological agents used in terrorist events. *Am. J. Emerg. Med.* 2022; 54:117–21. DOI: 10.1016/j.ajem.2022.01.056.
37. Australia Group Common Control List Handbook. Volume II: Biological Weapons-Related Common Control Lists. 2018.
38. Armengaud J. The proteomics contribution to the counter-bioterrorism toolbox in the post-COVID-19 era. *Expert Rev. Proteomics*. 2020; 17(7-8):507–11. DOI: 10.1080/14789450.2020.1822745.
39. Sachs J.D., Karim S.S.A., Akinin L., Allen J., Brosbøl K., Colombo F., Barron G.C., Espinosa M.F., Gaspar V., Gaviria A., Haines A., Hotez P.J., Koundouri P., Bascuñán F.L., Lee J.K., Pate M.A., Ramos G., Reddy K.S., Serageldin I., Thwaites J., Vike-Freiberga V., Wang C., Were M.K., Xue L., Bahadur C., Bottazzi M.E., Bullen C., Laryea-Adjei G., Amor Y.B., Karadag O., Lafortune G., Torres E., Barredo L., Bartels J.G.E., Joshi N., Hellard M., Huynh U.K., Khandelwal S., Lazarus J.V., Michie S. The Lancet Commission on lessons for the future from the COVID-19 pandemic. *Lancet*. 2022; 400(10359):1224–80. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01585-9.
40. Kemp L., Rhodes C. The Cartography of Global Catastrophic Governance. Global Challenges Foundation. 2020.
41. WHO. Biological weapons. (Cited 19 Apr 2022). [Internet]. Available from: https://www.who.int/health-topics/biological-weapons#tab=tab_2.

Authors:

Yudin M.A. North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; 41, Kirochnaya St., St. Petersburg, 191015, Russian Federation; e-mail: rektorat@szgmu.ru. State Research Testing Institute of Military Medicine; 4, Lesoparkovaya St., St. Petersburg, 195043, Russian Federation.

Bogacheva A.S., Buzmakova A.L., Potapova A.V., Romanova A.V., Kalyakina D.O., Shilov V.V. North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. 41, Kirochnaya St., St. Petersburg, 191015, Russian Federation. E-mail: rektorat@szgmu.ru.

Об авторах:

Юдин М.А. Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова; Российская Федерация, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41; e-mail: rektorat@szgmu.ru. Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины; Российская Федерация, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4.

Богачёва А.С., Бужмакова А.Л., Потапова А.В., Романова А.В., Калякина Д.О., Шилов В.В. Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова. Российская Федерация, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41. E-mail: rektorat@szgmu.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-42-49

УДК 616.98:579.841.93

Е.А. Анисимова, Д.А. Миргазов, Е.А. Додонова, И.А. Елизарова, Е.В. Панкова, К.А. Осянин

Применение HRM-анализа кривых плавления, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань, Российская Федерация

Цель исследования – оценка эффективности анализа кривых плавления высокого разрешения, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл. **Материалы и методы.** В качестве объектов исследования использовали 16 штаммов бруцелл видов *Brucella canis* (n=1), *B. abortus* (n=9), *B. melitensis* (n=2) и *B. suis* (n=4) различного географического происхождения. MLVA-типирование проводили методом классической ПЦР с последующим разделением ампликонов в агарозном геле и методом ПЦР-РВ с пост-амплификационным анализом кривых плавления VNTR-локусов в присутствии интеркалирующего красителя SybrGreen. Биоинформационный анализ выполняли с помощью программ Vector NTI 9.1 и Mega 11 (алгоритм MUSCLE). Филогенетический анализ проводили методом UPGMA с помощью программы Mega 11. **Результаты и обсуждение.** С помощью MLVA-подхода, основанного на анализе кривых плавления ПЦР-продуктов, полученных после амплификации VNTR-локусов, показано, что каждый из 16 штаммов бруцелл характеризуется уникальным профилем температур плавления. Методом ПЦР с последующим электрофорезом установлено, что, несмотря на высокую вариабельность использованных VNTR-последовательностей ($h=0,48...0,74$), только пост-амплификационные кривые плавления локусов Bru7, Bru9, Bru18, Bru21 обладали достаточной информативностью для определения генетического полиморфизма исследованных штаммов бруцелл. На основании филогенетического анализа последовательностей Bru7, Bru9, Bru18, Bru21 показано, что большинство исследуемых штаммов бруцелл распределялись на дендрограмме в соответствии с их таксономическим и географическим положением. Таким образом, HRM-анализ кривых плавления, полученных после амплификации локусов Bru7, Bru9, Bru18, Bru21, имеет потенциал использования для дифференциации штаммов бруцелл.

Ключевые слова: бруцеллез, *Brucella canis*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. abortus*, ПЦР, MLVA, кривые плавления.

Корреспондирующий автор: Анисимова Елизавета Алексеевна, e-mail: elizaveta-real@mail.ru.

Для цитирования: Анисимова Е.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Панкова Е.В., Осянин К.А. Применение HRM-анализа кривых плавления, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:42–49. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-42-49

Поступила 21.07.2023. Отправлена на доработку 29.08.2023. Принята к публ. 01.11.2023.

E.A. Anisimova, D.A. Mirgazov, E.A. Dodonova, I.A. Elizarova, E.V. Pankova, K.A. Osyenin

Use of HRM-Analysis of the Melting Curves Obtained after Amplification of VNTR-Loci for Identification and Differentiation of *Brucella* Strains

Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation

Abstract. The aim of the present study was to evaluate the effectiveness of analysis of the high resolution melting curves obtained after amplification of VNTR loci for the identification and differentiation of *Brucella* strains. **Materials and methods.** 16 strains of *Brucella* species – *B. canis* (n=1), *B. abortus* (n=9), *B. melitensis* (n=2), *B. suis* (n=4) – of different geographical origin were used as objects of the research. The MLVA-typing was performed using conventional PCR followed by separation of amplicons in agarose gel and real-time PCR with post-amplification analysis of the curves of VNTR loci melting in the presence of intercalating dye SybrGreen. Bioinformatics analysis was conducted with the help of Vector NTI 9.1, Mega 11 software (MUSCLE algorithm). Phylogenetic analysis was carried out applying UPGMA method using the Mega 11 program. **Results and discussion.** MLVA approach based on the analysis of the melting point curves of the obtained after amplification of VNTR-loci PCR fragments has shown that each of the 16 strains of *Brucella* is characterized by a unique melting temperature profile. PCR followed by electrophoresis has demonstrated that despite the high variability of the used VNTR sequences ($h=0,48...0,74$), only post-amplification melting curves of the Bru7, Bru9, Bru18, Bru21 loci had sufficient information content to determine the genetic polymorphism of the studied *Brucella* strains. Based on the results of phylogenetic analysis of the Bru7, Bru9, Bru18, Bru21 sequences, it has been found that the majority of the studied *Brucella* strains are distributed in the dendrogram in accordance with their taxonomic and geographical position. Thus, HRM analysis of melting curves obtained after amplification of the Bru7, Bru9, Bru18, Bru21 loci has the potential to be used for differentiating *Brucella* strains.

Key words: brucellosis, *Brucella canis*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. abortus*, PCR, MLVA, melting curves.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Elizaveta A. Anisimova, e-mail: elizaveta-real@mail.ru.

Citation: Anisimova E.A., Mirgazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Pankova E.V., Osyenin K.A. Use of HRM-Analysis of the Melting Curves Obtained after Amplification of VNTR-Loci for Identification and Differentiation of *Brucella* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2023; 4:42–49. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-42-49

Received 21.07.2023. Revised 29.08.2023. Accepted 01.11.2023.

Anisimova E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0416-6193>

Mirgazov D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4709-314X>

Dodonova E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6919-4064>

Elizarova I.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0802-435X>

Pankova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4446-4619>

Osyenin K.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2763-8605>

Бруцеллез – особо опасное инфекционно-аллергическое зоонозное заболевание, возбудителем которого являются бактерии рода *Brucella*. В настоящее время данный род включает в себя 12 видов, из которых наиболее патогенными для человека являются *B. melitensis*, *B. abortus* и некоторые биовары *B. suis* и *B. canis* [1]. Основными путями заражения человека бруцеллезом являются контакт с инфицированными животными, а также употребление в пищу сырой животноводческой продукции, полученной от больного поголовья [2]. Несмотря на примерно 97 % сходства на генетическом уровне, определенные виды бруцелл преимущественно ассоциируются с конкретными животными [3]. Так, основным хозяином у *B. abortus* является крупный рогатый скот, у *B. melitensis* – овцы и козы, у *B. canis* – собаки, а у *B. suis* – свиньи (биовары 1, 2 и 3), северные олени (биовар 4) и мышевидные грызуны (биовар 5) [4].

На протяжении последних десяти лет эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации характеризуется как достаточно напряженная и, как правило, определяется активностью эпизоотического процесса среди эпидемиологически значимых видов крупного (КРС) и мелкого (МРС) рогатого скота в скотоводческих и овцеводческих хозяйствах, а также на козьях и свинофермах [5]. Помимо угрозы общественному здоровью, бруцеллез наносит значительный экономический ущерб.

В мировой практике используются различные подходы (серологические, бактериологические и т.п.) для индикации и идентификации возбудителя бруцеллеза, определения его патогенного потенциала. Для проведения противоэпидемических мероприятий, а также расследования вспышек бруцеллезной инфекции возрастающее значение приобретают подходы, позволяющие проводить молекулярно-генетическую характеристику бруцелл на уровне штамма. В свою очередь для характеристики микроорганизмов с высоким уровнем гомологии ДНК, к которым относятся и бактерии рода *Brucella* [6–9], широкое применение получил многолокусный анализ числа варьируемых tandemных повторов (MLVA). Этот метод позволяет дифференцировать штаммы одного вида между собой, определять их эволюционное происхождение, а также принадлежность к тому или иному биовару. Традиционно гено-типирование включает в себя два последовательных этапа, а именно ПЦР-амплификацию VNTR-локусов и учет их размеров с помощью электрофореза. В данном исследовании мы рассмотрели возможность проведения MLVA в реальном времени с помощью подхода, основанного на анализе кривых плавления ПЦР-продуктов высокого разрешения, полученных

после амплификации VNTR-локусов. Аналогичная схема типирования была успешно применена нами для оценки генетического полиморфизма штаммов возбудителя сибирской язвы [10, 11].

Целью исследования является оценка эффективности анализа кривых плавления высокого разрешения, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали 16 штаммов бруцелл: *B. canis* RM 6/66, *B. suis* (1330, 6989, 183-1, У-1), *B. melitensis* (1565, 1190) и *B. abortus* (82, 19, R-1096, УФ-1, 54М, 287-9, 7856, 544, 1561) из Государственной коллекции штаммов возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Подготовку проб для дальнейших молекулярно-генетических исследований проводили согласно методическим указаниям МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Выделение ДНК бруцелл проводили с помощью набора «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия) согласно инструкции производителя. Для амплификации VNTR-локусов использовали праймеры [12], разработанные нами ранее на основе нуклеотидных последовательностей, традиционно используемых для MLVA [13]. Претерпевшие рид-зайн олигонуклеотидные затравки имеют температуру плавления ($50,83 \pm 0,27$) °C, однако при подборе условий проведения ПЦР *in vitro* установили, что наиболее оптимальной для отжига праймеров является температура 54 °C.

Реакционная ПЦР-смесь объемом 15 мкл содержала 2,5 мкл 10×ПЦР буфера, 1,5 мкл 25 mM MgCl₂, 5 пкМ каждого праймера, 2,5 мкл 2,5 mM dNTP, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 2,5 мкл ДНК матрицы, 5 мкл ddH₂O. Амплификацию проводили по следующей программе: начальная денатурация ДНК при 95 °C в течение 5 мин, далее 45 циклов: денатурация при 95 °C – 10 с, отжиг олигонуклеотидов при 54 °C – 30 с, элонгация при 72 °C – 10 с.

ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 1,5 % агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием. Визуализацию проводили с помощью UV-трансиллюминатора. Размер полученных

фрагментов определяли с использованием программы Gel Analyzer путем сравнения фрагмента с маркером молекулярной массы ДНК 100+ bp DNA Ladder (ЗАО «Евроген», Москва).

Реакционная смесь для постановки ПЦР-РВ объемом 15 мкл содержала 1,5 мкл 10×ПЦР-буфера с красителем SYBRGreen (ЗАО «Синтол», Россия), 25 mM раствора $MgCl_2$ (ЗАО «Синтол», Россия), 0,5 единиц Taq-полимеразы (ЗАО «Синтол», Россия), 2,5 mM дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 5 pM прямого и обратного праймера, 10 нг ДНК-матрицы, ddH₂O (до 15 мкл). Амплификацию проводили по следующей программе: начальная денатурация при 95 °C в течение 5 мин; 39 циклов: денатурация при 95 °C – 10 с, отжиг олигонуклеотидов при 54 °C – 30 с (детекция по каналу FAM) и элонгация при 72 °C – 10 с. После амплификации осуществляли анализ кривых плавления с использованием следующей программы: при температуре от 65 до 95 °C (шаг 0,2 °C) – 5 с. Графический анализ кривых плавления продуктов амплификации выполняли в программе CFX Manager™ (Bio-Rad, США).

Статистическую обработку результатов проводили в программе Microsoft Office Excel 2017. Для оценки вариабельности VNTR-локусов вычисляли индекс аллельного полиморфизма (h) [14].

Биоинформационный анализ осуществляли с помощью программ Vector NTI 9.1 и баз данных ресурсов NCBI (<https://www.ncbi.gov>). Множественное выравнивание выполнили с использованием алгоритма MUSCLE в программе Mega 11.

Филогенетический анализ проводили методом попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA). Для оценки достоверности филогенетических связей использовали многократную генерацию методом Bootstrap для 1000 независимых построений каждого филогенетического дерева.

Результаты и обсуждение

Для генотипирования штаммов возбудителя бруцеллеза использовали предложенную нами ранее схему MLVA, которая включает в себя анализ 15 VNTR-локусов с длиной мотива tandemных повторов от 6 до 134 п.н. [12].

Традиционно учет результатов MLVA осуществляют путем определения размера ПЦР-продуктов методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле с последующим секвенированием полученных ампликонов, а также с применением капиллярных анализаторов или с использованием зондов с флуоресцентной меткой [15]. Вышеперечисленные методики являются достаточно трудоемкими, а также требуют высокотехнологичного дорогостоящего оборудования и расходных материалов. Ранее нами был разработан альтернативный подход для MLVA-типирования штаммов *Bacillus anthracis*, основанный на пост-амплификационной детекции кривых

плавления VNTR-последовательностей с использованием интеркалирующих красителей [10]. Данный метод базируется на главном принципе HRM (high resolution melting): чем больше Г/Ц пар оснований содержит ПЦР-продукт, тем выше температура его плавления. В этом случае детекция результатов происходит в реальном времени и, как следствие, не требует дальнейших манипуляций с ампликонами, что значительно убыстряет и удешевляет процесс VNTR-типирования, а также снижает риск контаминации. Отметим, что ранее HRM успешно применялся для детекции однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) бруцелл с целью их индикации на видовом уровне [16, 17]. В данном исследовании мы впервые рассмотрели возможность использования пост-амплификационных кривых плавления для типизации бруцелл методом MLVA.

С этой целью для 16 штаммов бруцелл, относящихся к различным видам (*B. canis*, *B. suis*, *B. melitensis* и *B. abortus*) и биоварам, провели MLVA-типирование с пост-амплификационным анализом кривых плавления VNTR-локусов в режиме реального времени. ПЦР-РВ амплификацию провели в трех репликах, после чего рассчитали медианное значение (табл. 1). Для большинства штаммов результаты амплификации по локусам Bru4, Bru8, Bru10, Bru11 и Bru55 оказались отрицательными, поэтому их исключили из работы. Для остальных локусов разница между повторами составила $\leq 0,3$ °C и, как следствие, для дифференциации штаммов бруцелл на основании разниц температур плавления VNTR-локусов допустимым отличием приняли значение от 0,3 °C.

Как видно из табл. 1, каждый из 16 использованных в рамках данного исследования штаммов обладает уникальным профилем пост-амплификационных температур плавления VNTR-локусов. На этом основании можно предположить, что использованные штаммы бруцелл принадлежат к 16 различным генотипам.

Для штаммов *B. canis* RM 6/66, *B. suis* 1330, *B. suis* 183-Л, *B. melitensis* 1565, *B. melitensis* 1190, *B. abortus* R-1096, *B. abortus* 287-9, характеризующихся наиболее разнообразными температурами плавления ПЦР-продуктов, определили молекулярную массу VNTR-локусов с помощью классической ПЦР с последующим разделением ампликонов в агарозном геле. Также размеры VNTR-локусов референтных штаммов *B. canis* RM 6/66 и *B. suis* 1330 подтвердили *in silico*. Для этого с помощью программы Vector NTI 9.1 нуклеотидные последовательности I и II хромосом *B. canis* RM 6/66 и *B. suis* 1330, представленные в базе данных GenBank, ограничили соответствующими праймерами. Полученные для референтных штаммов размеры ампликонов перевели в числовой формат копий tandemных повторов. После чего путем экстраполяции рассчитали количество повторов в каждом локусе для остальных исследуемых штаммов. Результаты, проведенные по десяти локусам MLVA-типирования, представлены в табл. 2.

Таблица 1 / Table 1

Температуры плавления ПЦР-продуктов, полученных после амплификации VNTR-локусов исследуемых штаммов бруцелл
Melting points of PCR products obtained after amplification of VNTR-loci of the studied *Brucella* strains

Штамм Strain	Биовар Biovar	Локус, °C / Locus, °C									
		Bru6	Bru7	Bru9	Bru16	Bru18	Bru19	Bru21	Bru30	Bru43	Bru45
<i>B. canis</i> RM 6/66	—	84,4	84,1	84,3	81,1	82,2	86,4	84,4	87,9	85,2	89,5
<i>B. suis</i> 1330	1	84,3	84,1	81,3	80,6	81,7	86	84,4	87,6	84,6	89,3
<i>B. suis</i> 6989	1	84,3	83,6	81,3	80,5	81,5	86	83,8	87,5	84,6	89,4
<i>B. suis</i> 183-Л	2	84,4	84,1	84,1	80,4	82,4	86,6	84	87,6	85,1	89,4
<i>B. suis</i> Y-1	3	84,1	84,1	80,5	80,5	82,1	86	84	87,7	85,6	89,4
<i>B. melitensis</i> 1565	2	84,5	83,8	80,5	80,7	81,8	86,3	84,2	87,8	85,8	89,5
<i>B. melitensis</i> 1190	3	84,3	83,9	83,9	81	81,7	86,1	84,5	87,2	85,4	89,4
<i>B. abortus</i> 82	—	83,3	83,9	82	80,5	82,2	86	83,8	87,7	85,5	89,4
<i>B. abortus</i> 19	—	84,1	84,1	80,5	80,4	82	85,8	83,8	87,5	85,5	89,4
<i>B. abortus</i> R-1096	—	84,3	85	82	80,5	82,5	86	84,1	87,9	85,7	89,4
<i>B. abortus</i> 287-9	3	74,9	84,1	83,7	80,6	82,3	86,2	84	87,6	84,7	89,4
<i>B. abortus</i> 7856	6	84	84,1	80,5	80,5	82,2	86,2	84	87,2	85,1	89,5
<i>B. abortus</i> 54M	—	76	83,9	81	80,7	82,3	86,1	84	87,8	85,7	89,5
<i>B. abortus</i> 544	1	84,2	83,9	80,5	80,7	82,2	86	84,8	87,6	85,7	89,5
<i>B. abortus</i> 1561	7	75,8	84,6	82	80,6	82,2	86	84,1	87,7	85,6	89,4
<i>B. abortus</i> УФ-1	—	75,9	83,9	80,5	80,5	82,3	85,8	83,9	87,5	85,6	89,5

Примечание: в таблице представлено медианное значение, рассчитанное на основании значений трех повторностей.

Note: the table shows the median value calculated from the values of three replicates.

Отметим, что для амплификации участков генома, содержащих VNTR-последовательности, использовали модифицированный вариант праймеров для MLVA [12]. Поэтому молекулярная масса ПЦР-продуктов, полученных после амплификации VNTR-локусов, у референтных штаммов бруцелл отличалась от представленных в международных базах [13].

В целом установили, что использованная схема генотипирования обладает высокой дискриминирующей способностью ввиду высокой вариабельности использованных VNTR-локусов. Так, индекс разнообразия использованных VNTR-локусов находился в диапазоне от 0,48 до 0,74, наибольшей дискриминационной способностью обладал локус Bru9.

Вместе с тем полученные для шести из десяти использованных VNTR-локусов пост-амплификационные кривые плавления не обладали достаточной информативностью для определения их молекулярной массы. Так, вне зависимости от количества повторов в локусе Bru6, температура его плавления составляет $(84,4 \pm 0,1)$ °C. Наибольшую температуру плавления ампликона, полученного после амплификации локуса Bru16, наблюдали для штаммов *B. canis* RM 6/66 и *B. melitensis* 1190, содержащих в данном локусе пять повторов. Остальные штаммы содержат в данном локусе от трех до пяти повторов и характеризуются идентичными кривыми плавления локуса Bru16, различающимися менее чем на 0,2 °C. Вариабельность локусов Bru30 и Bru45 составила 0,55 и 0,48 соответственно. Однако значения темпе-

ратур плавления, полученные после амплификации данных локусов, имели различия между штаммами менее чем на 0,3 °C, следовательно, не являются достоверными. Для большинства бруцелл кривые плавления ПЦР-продуктов, полученные после амплификации локуса Bru19, не имели значимых отличий. Исключением является штамм *B. suis* 183-Л, содержащий в своем геноме наибольшее количество повторов в локусе Bru19 и демонстрирующий более высокую температуру плавления его ампликонов в сравнении с остальными штаммами. Что касается локуса Bru43, достоверные различия между значениями, полученными после плавления данных ампликонов, установлены только для содержащих два tandemных повтора штаммов *B. melitensis* 1565 и *B. abortus* R-1096. Следовательно, полученные данные о кривых плавления локуса Bru43 позволяют идентифицировать только штаммы, содержащие два повтора в данном локусе.

Согласно методике HRM, чем выше температура плавления ПЦР-продукта, полученного после амплификации VNTR-локуса, тем больше tandemных повторов он содержит [10]. Ожидаемая корреляция прослеживалась только для четырех локусов, а именно Bru7, Bru9, Bru18, Bru21. Следовательно, кривые плавления только этих локусов могут быть использованы для определения генетического полиморфизма штаммов бруцелл.

На следующем этапе работы для всех 16 штаммов бруцелл провели сравнительный анализ VNTR-последовательностей Bru7, Bru9, Bru18, Bru21.

Таблица 2 / Table 2

Характеристика VNTR-локусов исследуемых штаммов бруцелл
Characterization of VNTR-loci of the studied *Brucella* strains

Штамм Strain	Локус / Locus																													
	Bru6			Bru7			Bru9			Bru16			Bru18			Bru19			Bru21			Bru30			Bru43			Bru45		
	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов
<i>B. canis</i> RM 6/66*	273	84,4	2	165	84,1	6	160	84,3	7	168	81,1	5	146	82,2	5	170	86,4	40	175	84,4	9	129	87,9	3	163	85,2	1	188	89,5	5
<i>B. suis</i> 1330*	273	84,3	2	165	84,1	6	144	81,3	5	168	80,6	5	138	81,7	4	164	86	38	175	84,4	9	129	87,6	3	163	84,6	1	188	89,3	5
<i>B. suis</i> 183-II	273	84,4	2	165	84,1	6	160	84,1	7	160	80,3	4	166	82,4	7	184	86,6	44	159	84	7	121	87,6	2	151	85,1	0	134	89,4	2
<i>B. melitensis</i> 1565	139	84,5	1	157	83,8	5	128	80,5	3	152	80,7	3	138	81,8	4	178	86,3	42	167	84,2	8	185	87,8	6	175	85,8	2	152	89,5	3
<i>B. melitensis</i> 1190	273	84,3	2	157	83,9	5	152	83,9	6	168	81	5	138	81,7	4	170	86,1	40	175	84,5	9	137	87,2	4	163	85,4	1	188	89,4	5
<i>B. abortus</i> R-1096	139	84,3	1	197	85	10	148	82	5	152	80,5	4	162	82,5	7	170	86	42	167	84,1	8	129	87,9	3	175	85,7	2	152	89,4	3
<i>B. abortus</i> 287-9	–	–	0	165	84,1	6	152	83,7	6	152	80,6	4	162	82,3	7	178	86,2	40	159	84	7	129	87,6	3	163	84,7	1	134	89,4	2
Варибель- ность локуса (h) Locus varia- bility (h)	0,57			0,55				0,74			0,55			0,67			0,64			0,61			0,55			0,48			0,61	

Примечание: * отмечены штаммы, размеры VNTR-локусов которых подтверждены *in silico*.

Note: * strains the size of VNTR-loci of which is confirmed *in silico*.

С этой целью на основании полученных для семи штаммов бруцелл данных о температурах плавления локусов Bru7, Bru9, Bru18, Bru21, соотносящихся с их размером, определили количество повторов в данных локусах для остальных девяти штаммов бруцелл. Полученные результаты подтвердили методом классической ПЦР с электрофоретическим разделением продуктов амплификации в агарозном геле, после чего построили дендрограмму, представленную на рисунке.

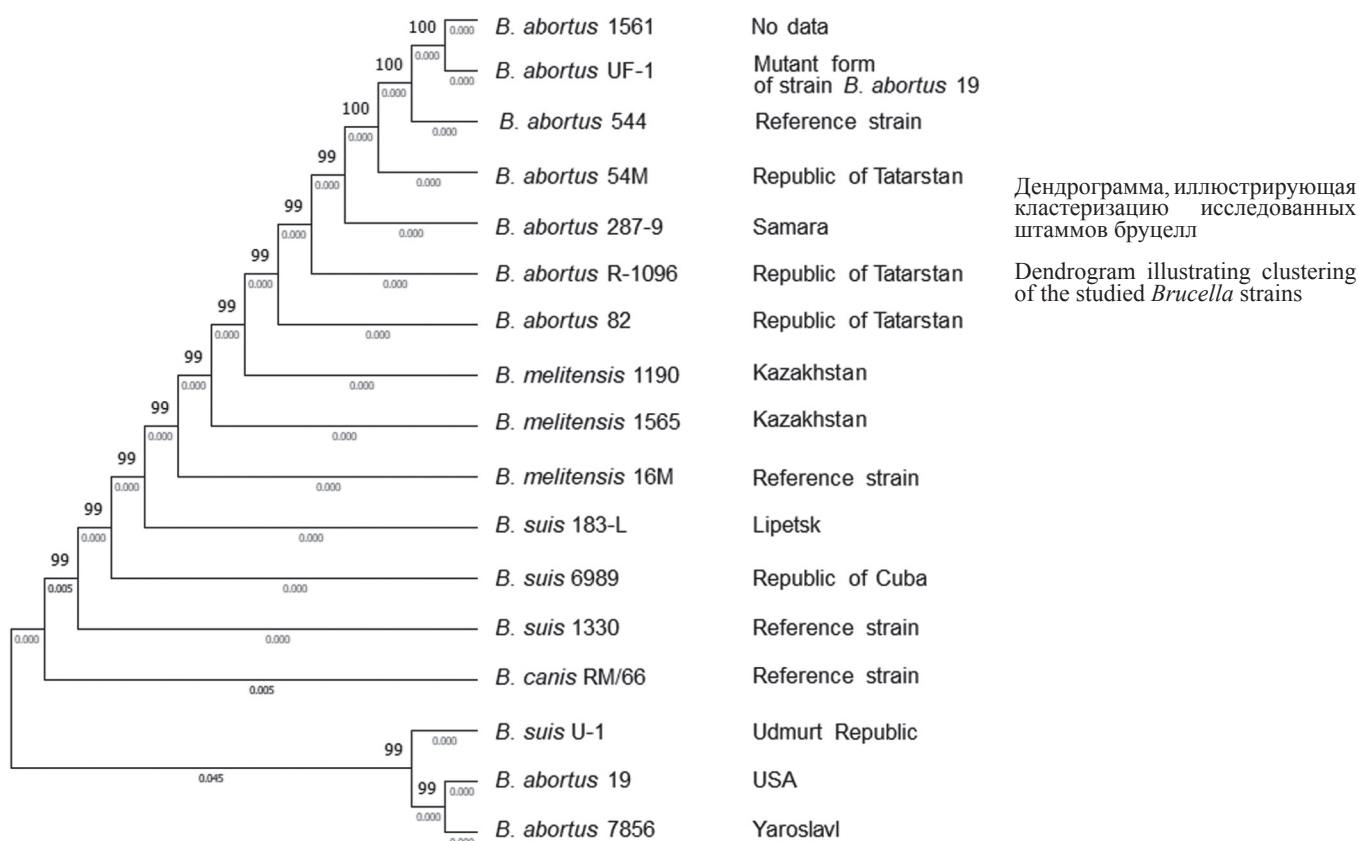
В результате кластерного анализа установили деление всех штаммов на два кластера, самый крупный из которых представлен штаммами видов *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*, группирующихся на дендрограмме согласно их видовой принадлежности и географическому происхождению. В частности, штаммы *B. abortus* 54М, 287-9, R-1096, 82, выделенные на территории Приволжского федерального округа, формируют соседние ветви в одном кластере. Отдельную подгруппу составили вакцинные штаммы *B. abortus* 1561, УФ-1 и референтный штамм *B. abortus* 544. Штамм *B. abortus* 1561 впервые выделен в 1971 г. в Балхашском районе (Казахстан) от предварительно вакцинированного животного, поэтому установить его точное географическое происхождение не представляется возможным. Находящийся с ним в одной кладе штамм *B. abortus* УФ-1 является мутантной формой производственного штамма *B. abortus* 19, поскольку получен путем воздействия УФ-излучения на данный микроорганизм [18]. Однако отметим, что, несмотря

на генетическое родство *B. abortus* УФ-1 и 1561, данные штаммы, вероятно, происходят из разных географических регионов, поскольку исходный штамм *B. abortus* 19 и его УФ-форма находятся в разных кластерах.

Штаммы II и III биовара вида *B. melitensis*, выделенные на территории Казахстана, расположились на соседних ветках, выходящих из разных узлов. Аналогичным образом группировались относящиеся к I и II биоварам штаммы *B. suis* 6989, 1330 и 183-Л. Исключением является штамм III биовара *B. suis* У-1, который образует отдельный кластер вместе с кладой, состоящей из штаммов *B. abortus* 19 и 7856. Следовательно, использование только четырех VNTR-локусов в схеме HRM-анализа оказалось недостаточным для дифференциации данных штаммов между собой.

Как видно из представленной на рисунке дендрограммы, все четыре штамма *B. suis* вышли из общего с *B. canis* RM 6/66 узла, что свидетельствует об их генетическом родстве. Данный факт находит подтверждение в исследованиях отечественных и зарубежных авторов [19, 20]. Так, в работе Ю.К. Кулакова и соавт. референтные штаммы *B. canis* RM 6/66 и *B. suis* 1330 составляли общую кладу филогенетического дерева [19].

Таким образом, установили, что проведенное по четырем локусам Bru7, Bru9, Bru18, Bru21 MLVA-типирование позволяет систематизировать большинство использованных штаммов бруцелл в соответствии с их таксономическим положением.



Из этого можно сделать вывод, что MLVA с последующим анализом кривых плавления ПЦР-продуктов, полученных после амплификации VNTR-локусов, имеет потенциал эффективного применения для проведения видовой и, в ряде случаев, штаммовой дифференциации бруцелл. Однако тот факт, что штаммы *B. abortus* 19 и 7856 объединились в один кластер со штаммом *B. suis* Y-1, свидетельствует о том, что схема генотипирования, основанная только на четырех VNTR-локусах Bru7, Bru9, Bru18, Bru21, имеет свои ограничения. Поэтому для повышения дискриминирующей способности разработанного подхода к типированию бруцелл необходимо продолжать поиск оптимальных VNTR-локусов, пригодных для проведения MLVA методом HRM-анализа. Также данный подход требует дальнейшей верификации, в частности с использованием секвенирования.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. El-Sayed A., Awad W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2018; 6(Suppl.):S31–S35. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2018.01.008.
2. Пономаренко Д.Г., Скударева О.Н., Хачатурова А.А., Лукашевич Д.Е., Жаринова И.В., Даурова А.В., Германова А.Н., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Манин Е.А., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Бруцеллез: тенденции развития ситуации в мире и прогноз на 2022 г. в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; 2:36–45. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-36-45.
3. Suárez-Esquivel M., Chaves-Olarte E., Moreno E., Guzmán-Verri C. *Brucella* genomics: Macro and micro evolution. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(20):7749. DOI: 10.3390/ijms21207749.
4. Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Хачатурова А.А., Вольникова А.С., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Филогеография штаммов *Brucella melitensis* на основе анализа SNP полных геномов. *Бактериология.* 2016; 1(1):73–9. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-73-79.
5. Насибуллин Р.Ю., Тухватуллина Л.А., Богова Я.А., Сафина Г.М., Косарев М.А. Бруцеллез: его распространение и профилактика. *Ветеринарный врач.* 2021; 1:38–43. DOI: 10.33632/1998-698x.2021-1-38-44.
6. Liu Z.-G., Di D.-D., Wang M., Liu R.-H., Zhao H.-Y., Piao D.-R., Tian G.-Z., Fan W.-X., Jiang H., Cui B.-Y., Xia X.-Z. MLVA genotyping characteristics of human *Brucella melitensis* isolated from Ulanqab of Inner Mongolia, China. *Front. Microbiol.* 2017; 8:6. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00006.
7. Шакирова Л.И., Ляпустина Л.В., Головнева С.И., Швецова Н.М. Применение молекулярно-генетических методов для характеристики клинических изолятов бруцеллезного микроба. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2014; 2:54–9.
8. Кузнецова И.В., Ковалев Д.А., Евченко Ю.М., Шакирова Л.И., Швецова Н.М., Пономаренко Д.Г., Писаренко С.В., Жиров А.М., Лукина А.А., Куличенко А.Н. Изучение генетического разнообразия штаммов бруцелл, выделенных в Северо-Кавказском федеральном округе. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; 3:58–62. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-58-62.
9. Хачатурова А.А., Пономаренко Д.Г., Ковалев Д.А., Германова А.Н., Лукашевич Д.Е., Русанова Д.В., Сердюк Н.С., Семенов О.В., Жиров А.М., Катюнина Л.С., Куличенко А.Н. Анализ заболеваемости людей бруцеллезом и молекулярно-биологическая характеристика изолятов *Brucella melitensis* на длительном неблагоприятных по бруцеллезу территориях юга европейской части России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022; 99(1):63–74. DOI: 10.36233/0372-9311-185.
10. Анисимова Е.А., Фахрутдинов Н.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Горбунова М.Е., Хаммадов Н.И., Зайнуллин Л.И., Осянин К.А. Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* на основе SNP- и VNTR-полиморфизма геномов. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2022; 26(6):560–7. DOI: 10.18699/VJGB-22-68.
11. Фахрутдинов Н.А., Анисимова Е.А., Миргазов Д.А., Мустафина Э.Н., Осянин К.А. Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* методом анализа температур плавления продуктов ПЦР, полученных после амплификации VNTR локусов. *Ветеринарный врач.* 2023; 2:41–6. DOI: 10.33632/1998-698x.2023.2.41.
12. Хаммадов Н.И., Осянин К.А., Усольцев К.В., Фаизов Т.Х., Хаммадова А.В., Шуралев Э.А. Маркерные локусы генома бруцелл для дифференциальной ПЦР индикации патогенных штаммов. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2018; 3:88–93. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-88-93.
13. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoeud F., Nöckler K., Neubauer H., Guilloteau L.A., Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006; 6:9. DOI: 10.1186/1471-2180-6-9.
14. Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986; 51(5):873–84. DOI: 10.1128/aem.51.5.873-884.1986.
15. Ковалев Д.А., Кузнецова И.В., Жиров А.М., Сердюк Н.С., Жилченко Е.Б., Пономаренко Д.Г., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Куличенко А.Н. Генетическое типирование штаммов *Brucella melitensis* на основе анализа вариабельности INDEL-локусов. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2022; 12(1):81–6. DOI: 10.18565/epidem.2022.12.1.81-6.
16. Gopal K.K., Sells J., Lee R., Beckstrom-Sternberg S.M., Foster J.T., Whatmore A.M. Development and assessment of multiplex high resolution melting assay as a tool for rapid single-tube identification of five *Brucella* species. *BMC Res. Notes.* 2014; 7:903. DOI: 10.1186/1756-0500-7-903.
17. Girault G., Perrot L., Mick V., Ponsart C. High-resolution melting PCR as rapid genotyping tool for *Brucella* species. *Microorganisms.* 2022; 10(2):336. DOI: 10.3390/microorganisms10020336.
18. Алимов А.М., Ахмадеев Р.М., Габидуллина Р.Г., Сазонова Т.Я. Штамм *Brucella abortus* УФ-1 для приготовления биологических препаратов для диагностики и специфической профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных. Патент РФ № 2425148, опубл. 27.07.2011.
19. Кулаков Ю.К., Цирельсон Л.Е., Желудков М.М. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов бруцелл, выделенных от собак и оленей в различных регионах России. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2012; 4:28–33. DOI: 10.3103/S0891416812040052.
20. Guzmán-Verri C., Suárez-Esquivel M., Ruiz-Villalobos N., Zygmunt M.S., Gonnet M., Campos E., Viquez-Ruiz E., Chacón-Díaz C., Aragón-Aranda B., Conde-Álvarez R., Moriyón I., Blasco J.M., Muñoz P.M., Baker K.S., Thomson N.R., Cloeckaert A., Moreno E. Genetic and phenotypic characterization of the etiological agent of canine orchitis epididymitis smooth *Brucella* sp. BCCN84.3. *Front. Vet. Sci.* 2019; 6:175. DOI: 10.3389/fvets.2019.00175.

References

1. El-Sayed A., Awad W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2018; 6(Suppl.):S31–S35. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2018.01.008.
2. Ponomarenko D.G., Skudareva O.N., Khachaturova A.A., Lukashovich D.E., Zharinova I.V., Daurova A.V., Germanova A.N., Logvinenko O.V., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Manin E.A., Maletskaia O.V., Kulichenko A.N. [Brucellosis: trends in the development of situation in the world and forecast for 2022 in the Russian Federation]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (2):36–45. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-36-45.
3. Suárez-Esquivel M., Chaves-Olarte E., Moreno E., Guzmán-Verri C. *Brucella* genomics: Macro and micro evolution. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(20):7749. DOI: 10.3390/ijms21207749.
4. Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Khachaturova A.A., Volynkina A.S., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. [Phylogeography of *Brucella melitensis* strains based on SNP analysis of complete genomes]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2016; 1(1):73–9. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-73-79.
5. Nasibullin R.Yu., Tikhvatullina L.A., Bogova Ya.A., Safina G.M., Kosarev M.A. [Brucellosis: its distribution and prevention]. *Veterinarny Vrach [Veterinarian]* 2021; (1):38–43. DOI: 10.33632/1998-698x.2021-1-38-44.
6. Liu Z.-G., Di D.-D., Wang M., Liu R.-H., Zhao H.-Y., Piao D.-R., Tian G.-Z., Fan W.-X., Jiang H., Cui B.-Y., Xia X.-Z. MLVA genotyping characteristics of human *Brucella melitensis* isolated from Ulanqab of Inner Mongolia, China. *Front. Microbiol.* 2017; 8:6. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00006.

7. Shakirova L.I., Lyapustina L.V., Golovneva S.I., Shvetsova N.M. [Application of molecular-genetic methods to characterize clinical isolates of brucellosis microbe]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2014; (2):54–9.
8. Kuznetsova I.V., Kovalev D.A., Evchenko Yu.M., Shakirova L.I., Shvetsova N.M., Ponomarenko D.G., Pisarenko S.V., Zhirov A.M., Lukina A.A., Kulichenko A.N. [The study of genetic diversity of brucella strains isolated in the North-Caucasian Federal District]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (3):58–62. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-58-62.
9. Khachaturova A.A., Ponomarenko D.G., Kovalev D.A., Germanova A.N., Lukashevich D.E., Rusanova D.V., Serdyuk N.S., Semenko O.V., Zhirov A.M., Katunina L.S., Kulichenko A.N. [Analysis of human brucellosis incidence and molecular-biological characteristics of *Brucella melitensis* isolates on long-term brucellosis-affected areas in the south of the European part of Russia]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2022; 99(1):63–74. DOI: 10.36233/0372-9311-185.
10. Anisimova E.A., Fakhrutdinov N.A., Mirgazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Gorbunova M.E., Khammatov N.I., Zainullin L.I., Osyanin K.A. [Differentiation of *Bacillus anthracis* strains based on SNP- and VNTR-polymorphism of genomes]. *Vavilovsky Zhurnal Genetiki i Selekcii [Vavilov Journal of Genetics and Selection]*. 2022; 26(6):560–7. DOI: 10.18699/VJGB-22-68.
11. Fakhrutdinov N.A., Anisimova E.A., Mirgazov D.A., Mustafina E.N., Osyanin K.A. [Differentiation of *Bacillus anthracis* strains through analyzing the melting temperatures of PCR products obtained after amplification of VNTR loci]. *Veterinarny Vrach [Veterinarian]*. 2023; (2):41–6. DOI: 10.33632/1998-698X_2023_2_41.
12. Khammatov N.I., Osyanin K.A., Usol'tsev K.V., Faizov T.K., Khammatova A.V., Shuralev E.A. [Marker loci in *Brucella* genome for differential PCR indication of pathogenic strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (3):88–93. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-88-93.
13. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoeud F., Nöckler K., Neubauer H., Guilloteau L.A., Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006; 6:9. DOI: 10.1186/1471-2180-6-9.
14. Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986; 51(5):873–84. DOI: 10.1128/aem.51.5.873-884.1986.
15. Kovalev D.A., Kuznetsova I.V., Zhirov A.M., Serdyuk N.S., Zhilchenko E.B., Ponomarenko D.G., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Kulichenko A.N. [Genetic typing of *Brucella melitensis* strains based on analysis of the variability of INDEL loci]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]*. 2022; 12(1):81–6. DOI: 10.18565/epidem.2022.12.1.81-6.
16. Gopaul K.K., Sells J., Lee R., Beckstrom-Sternberg S.M., Foster J.T., Whatmore A.M. Development and assessment of multiplex high resolution melting assay as a tool for rapid single-tube identification of five *Brucella* species. *BMC Res. Notes.* 2014; 7:903. DOI: 10.1186/1756-0500-7-903.
17. Girault G., Perrot L., Mick V., Ponsart C. High-resolution melting PCR as rapid genotyping tool for *Brucella* species. *Microorganisms.* 2022; 10(2):336. DOI: 10.3390/microorganisms10020336.
18. Alimov A.M., Akhmadeev R.M., Gabidullina R.G., Sazonova T.Ya. [*Brucella abortus* strain UV-1 for the production of biological preparations for the diagnosis and specific prevention of brucellosis in farm animals]. RF Patent No. 2425148, publ. Jul 27, 2011.
19. Kulakov Yu.K., Tsirel'son L.E., Zheludkov M.M. [Molecular-genetic characteristics of *Brucella* isolates isolated from dogs and deer in various regions of Russia]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2012; (4):28–33. DOI: 10.3103/S0891416812040052.
20. Guzmán-Verri C., Suárez-Esquivel M., Ruiz-Villalobos N., Zygmunt M.S., Gonnet M., Campos E., Viquez-Ruiz E., Chacón-Díaz C., Aragón-Aranda B., Conde-Álvarez R., Moriyón I., Blasco J.M., Muñoz P.M., Baker K.S., Thomson N.R., Cloeckaert A., Moreno E. Genetic and phenotypic characterization of the etiological agent of canine orchitis epididymitis smooth *Brucella* sp. BCCN84.3. *Front. Vet. Sci.* 2019; 6:175. DOI: 10.3389/fvets.2019.00175.

Authors:

Anisimova E.A., Mirgazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Pankova E.V., Osyanin K.A. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety. Academic Town-2, Kazan, 420075, Russian Federation. E-mail: vnivi@mail.ru.

Об авторах:

Анисимова Е.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Панкова Е.В., Осянин К.А. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности. Российская Федерация, 420075, Казань, Научный городок-2. E-mail: vnivi@mail.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-50-61

УДК 616.98:579.842.23(575.2)

С.К. Бердиев¹, Г.А. Ерошенко², А.Н. Балыкова², Н.Т. Усенбаев¹, Н.Т. Кебекбаева¹, А.К. Джапарова¹,
Ж. Муканметесен уулу³, Д. Жумашов⁴, А.Ш. Ражапбаева⁵, А.М. Юлдашева¹, Е.Г. Оглодин²,
А.Д. Катышев², А.А. Кузнецов², А.В. Фадеева², В.В. Кутырев²

Современные диагностические технологии в исследовании полевого материала 2023 г. из природных очагов чумы Кыргызской Республики

¹Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика; ²ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ³Ат-Башиинское противочумное отделение РЦКиООИ МЗ КР, Ат-Баши, Кыргызская Республика; ⁴Каракольское противочумное отделение РЦКиООИ МЗ КР, Каракол, Кыргызская Республика; ⁵Ошское противочумное отделение РЦКиООИ МЗ КР, Ош, Кыргызская Республика

Цель работы – анализ результатов исследования полевого материала, полученного в 2023 г. в природных очагах чумы Кыргызской Республики (КР), с помощью современных диагностических технологий. **Материалы и методы.** Изучено 1435 биологических образцов из Тянь-Шаньского, Алайского и Таласского высокогорных очагов КР с использованием традиционных методов лабораторной диагностики чумы: микробиологических, иммунологических, биологических, а также современных молекулярно-генетических методов. Индикацию полученных образцов на наличие ДНК возбудителя чумы проводили с помощью ПЦР-РВ, а наличие антител к чумному микробу выявляли методом иммуноферментного анализа. Молекулярную идентификацию штаммов *Yersinia pestis* по их принадлежности к подвидам, биоварам, филогенетическим линиям проводили методом ПЦР-РВ с применением способа выявления однонуклеотидных замен с помощью анализа кривых плавления продуктов. **Результаты и обсуждение.** Разработан и прошел практическую проверку способ молекулярной идентификации штаммов *Y. pestis* из очагов чумы КР методом выявления однонуклеотидных замен с помощью анализа кривых плавления продуктов (HMR-анализ) с использованием комплекта сконструированных праймеров. Установлена принадлежность выделенных в Сарыджазском автономном очаге Тянь-Шаньского высокогорного очага штаммов *Y. pestis* к античному биовару основного подвида, филогенетической ветви 0.ANT5. Исследовано филогенетическое родство выделенных в 2023 г. штаммов *Y. pestis* по данным полногеномного SNP-анализа. Установлены участки эпизоотической активности в Восточном Алае. Полученные данные свидетельствуют о продолжающейся активизации очагов чумы КР. Также обсуждаются участки территории КР, перспективные для проведения палеогеномных исследований.

Ключевые слова: чума, природные очаги Кыргызской Республики, штаммы *Y. pestis*, диагностика.

Корреспондирующий автор: Бердиев Сталбек Кабылович, e-mail: berdiev.1962@mail.ru.

Для цитирования: Бердиев С.К., Ерошенко Г.А., Балыкова А.Н., Усенбаев Н.Т., Кебекбаева Н.Т., Джапарова А.К., Муканметесен уулу Ж., Жумашов Д., Ражапбаева А.Ш., Юлдашева А.М., Оглодин Е.Г., Катышев А.Д., Кузнецов А.А., Фадеева А.В., Кутырев В.В. Современные диагностические технологии в исследовании полевого материала 2023 г. из природных очагов чумы Кыргызской Республики. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 4:50–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-50-61

Поступила 28.11.2023. Принята к публ. 05.12.2023.

S.K. Berdiev¹, G.A. Eroshenko², A.N. Balykova², N.T. Usenbaev¹, N.T. Kebekbaeva¹,
A.K. Dzhaparova¹, Zh. Mukanmetesen uulu³, D. Zhumashov⁴, A.Sh. Razhapbaeva⁵,
A.M. Yuldasheva¹, E.G. Oglochin², A.D. Katyshev², A.A. Kuznetsov², A.V. Fadeeva², V.V. Kutyrev²

Modern Diagnostic Technologies in the Study of the Field Material Collected from the Natural Plague Foci of the Kyrgyz Republic in 2023

¹Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Bishkek, Kyrgyz Republic;

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

³At-Bashinsky Anti-Plague Department of the Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, At-Bashi, Kyrgyz Republic;

⁴Karakol Anti-Plague Department of the Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Karakol, Kyrgyz Republic;

⁵Osh Anti-Plague Department of the Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Osh, Kyrgyz Republic

Abstract. The aim of the work was to analyze the results of investigating the field material obtained from natural plague foci of the Kyrgyz Republic (KR) in 2023, using modern diagnostic technologies. **Materials and methods.** 1435 biological samples from the Tien Shan, Alai and Talas high-mountain foci of the Kyrgyz Republic were studied using conventional methods of laboratory diagnosis of plague: microbiological, immunological, biological; as well as modern molecular-genetic methods. Testing of the obtained samples for the presence of plague pathogen DNA was carried out using RT-PCR; and the presence of antibodies to the plague microbe was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Molecular identification of *Yersinia pestis* strains according to their appurtenance to subspecies, biovars, and phylogenetic lineages was performed by RT-PCR using the method of identifying single-nucleotide substitutions based on the analysis of melting curves of products. **Results and discussion.** An approach to the molecular identification of *Y. pestis* strains from plague foci of the KR has been developed and validated through identifying single-nucleotide substitutions using the analysis of product melting curves (HMR-analysis) with a set of designed primers. It

has been established that *Y. pestis* strains isolated in the Sarydzhas autonomous focus of the Tien Shan high-mountain focus belong to the biovar *antiqua* of the main subspecies, phylogenetic branch 0.ANT5. The phylogenetic relation of *Y. pestis* strains isolated in 2023 was studied based on genome-wide SNP analysis. Areas of epizootic activity in Eastern Alai have been identified. The data obtained indicate the sustained activation of plague foci in the KR. Areas of the territory of the KR that are promising for paleogenomic research are also discussed.

Key words: plague, natural foci of the Kyrgyz Republic, *Y. pestis* strains, diagnostics.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Acknowledgements: We thank V.A. Kol'chenko, a research officer at the Institute of History, Archeology and Ethnology of the National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic, for consultations on the localization of archaeological sites on the territory of Kyrgyzstan.

Corresponding author: Stalbek K. Berdiev, e-mail: berdiev.1962@mail.ru.

Citation: Berdiev S.K., Eroshenko G.A., Balykova A.N., Usenbaev N.T., Kebekbaeva N.T., Dzhaparova A.K., Mukanmetesen uulu Zh., Zhumashov D., Razhapbaeva A.Sh., Yuldasheva A.M., Ogolodin E.G., Katyshev A.D., Kuznetsov A.A., Fadeeva A.V., Kutryev V.V. Modern Diagnostic Technologies in the Study of the Field Material Collected from the Natural Plague Foci of the Kyrgyz Republic in 2023. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:50–61. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-50-61

Received 28.11.2023. Accepted 05.12.2023.

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

Balykova A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3766-7979>

Dzhaparova A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1067-0940>

Ogolodin E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2955-3034>

Katyshev A.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8260-4670>

Kuznetsov A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0677-4846>

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

В Кыргызской Республике (КР) находятся три природных очага чумы: Тянь-Шаньский, Алайский и Таласский, – пространственно изолированные друг от друга и занимающие площадь более 320 тыс. га, что составляет 16,3 % от территории страны [1]. Эпизоотии впервые выявлены в Тянь-Шаньском высокогорном очаге в 1942–1943 гг., в Таласском – в 1977 г. Вспышки и случаи чумы регистрировались в Тянь-Шаньском высокогорном очаге в 1907, 1910, 1914, 1928, 1942, 1947, 1952, 1958, 1962, 1981, 2013 гг. [2]. Комплексный анализ фенотипических и генетических свойств штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в природных очагах КР в период 1928–1984 гг., показал, что они преимущественно относились к ветвям 0.ANT3 и 0.ANT5 античного биовара основного подвида, встречались также штаммы филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биовара основного подвида [3]. В Таласском высокогорном очаге установлена циркуляция штаммов филогенетической ветви 0.PE4t, которая в соответствии с усовершенствованной подвидовой классификацией относится к таласскому биовару центральноазиатского (неосновного) подвида [4]. В этом же очаге был изолирован штамм средневекового биовара основного подвида филогенетической ветви 2.MED1.

Благодаря проведенным в 1971–1989 гг. оздоровительным мероприятиям методом глубинной дезинсекции нор сурков эпизоотическая активность Тянь-Шаньского природного очага значительно снизилась. Эпизоотии чумы в популяциях сурков не регистрировали до 23 и более лет. В дальнейшем в результате активизации эпизоотических процессов в 2012 г. в Сарыджазском автономном очаге Тянь-Шаньского высокогорного очага чумы от грызунов было изолировано 6 культур чумного микроба *Y. pestis*. В 2013 г. в этом же очаге зарегистрирован 1 случай бубонной чумы с летальным исходом. В 2014 г. от сурков – основных носителей чумы и от их специфических паразитов изоли-

ровано 3 культуры чумного микроба [5]. В 2015 г. от сурков в Верхненарынском автономном очаге Тянь-Шаньского очага выделено 2 культуры *Y. pestis*, в 2016 г. в Сарыджазском автономном очаге от серых сурков и блох получено 4 культуры возбудителя. Впоследствии в 2019 г. в Сарыджазском и Верхненарынском автономных очагах от серых сурков и их эктопаразитов получено 5 культур *Y. pestis*, а в 2020 г. 6 культур изолировано в Сарыджазском очаге от серых сурков и блох *Oropsylla silantiewi*. По данным комплексного исследования свойств штаммов *Y. pestis*, выделенных в XXI в. в Сарыджазском и Верхненарынском очагах, была установлена их принадлежность к античному биовару основного подвида, филогенетической линии 0.ANT5 [6, 7]. Постоянное выделение культур возбудителя чумы в 2012–2020 гг. после длительного межэпизоотического периода свидетельствует об активизации этих территорий Тянь-Шаньского высокогорного очага, что требует проведения расширенных мероприятий, направленных на обеспечение эпидемиологического благополучия и предупреждения распространения чумы.

В 2023 г. сотрудниками Республиканского центра карантинных и особо опасных инфекций Минздрава КР (РЦКиООИ) и сотрудниками Атбашинского, Каракольского, Ошского и Таласского противочумных отделений (ПЧО) при участии специалистов ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора проведено расширенное обследование природных очагов чумы КР. При лабораторном исследовании полевого материала, добытого в Сарыджазском высокогорном очаге, выделены три штамма *Y. pestis*.

Цель работы – анализ результатов исследования полевого материала сезона 2023 г. из природных очагов чумы КР с помощью современных диагностических технологий и комплексное изучение свойств выделенных здесь штаммов *Y. pestis*.

Материалы и методы

Изученные биологические образцы получены во время полевого сезона 2023 г. на различных территориях высокогорных очагов чумы КР. Исследования полевого материала проводились с помощью микробиологических, иммунологических, биологических, молекулярно-генетических методов. Для проведения микробиологического анализа и выделения культур использовались суспензии внутренних органов, для иммуноферментного анализа (ИФА) на наличие антител – смывы из грудной полости отловленных грызунов. Подозрительные на чуму культуры изучались с помощью традиционных методов лабораторной диагностики чумы [8]. Детекцию ДНК возбудителя чумы во всех полевых образцах проводили методом ПЦР-РВ с применением набора «Ген *Yersinia pestis* индикация – РГФ» и методом иммуноферментного анализа с помощью тест-набора «ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*» (ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Россия). Молекулярную идентификацию выделенных штаммов *Y. pestis* выполняли методом ПЦР-РВ в традиционном формате и с применением способа выявления однонуклеотидных замен с помощью анализа кривых плавления продуктов ПЦР – HMR-анализ (от англ. high resolution melt) [9, 10]. В последнем варианте ПЦР-РВ проводили с использованием красителя EVA Green (ООО «Синтол», Россия). ПЦР-РВ в традиционном формате выполняли с помощью набора Encyclo Plus PCR kit (ЗАО «Евроген», Россия). Для выявления специфических делеций и аллельных полиморфизмов, маркерных для филогенетических линий *Y. pestis* из очагов чумы КР, был разработан комплект праймеров, включающий сконструированные нами ранее и в рамках этой работы олигонуклеотидные праймеры. ДНК для проведения ПЦР-РВ выделяли набором «РИБО-преп» (AmpliSens, Россия).

Для полногеномного секвенирования ДНК штаммов *Y. pestis* получали с использованием набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Полногеномное секвенирование выполняли в системе Ion S5 XL System (Thermo Fischer Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Обработку данных, контроль качества и сборку последовательностей сырых ридов *de novo* проводили с помощью Ion Torrent Suite software package, 5.12, FastQC v0.12.0, unicycler v0.5.0. Полученные риды собирали в контиги со средним покрытием на геном 98,56 % (50х глубина прочтения). Средний размер собранного генома составил 4,55 м.п.н. Коровые SNPs выявляли путем выравнивания контигов штаммов *Y. pestis* на геноме CO92 (номер доступа в NCBI GenBank – NC_003143) с помощью программы Snippy 4.6, затем удаляли 28 гомоплазий SNPs. Полученный набор SNPs содержал только коровую область генома (1527 SNPs). Дендрограмму строили по алгоритму Maximum Likelihood с применением программы FastTree, встроенной в Snippy 4.6,

модели GTR, подобранной в программе Jmodeltest2 с учетом AIC-критерия. Использовали 500 бутстреп-реплик. Визуализацию филогенетического дерева выполняли в программе FigTree v1.4.4.

Результаты и обсуждение

Всего в полевой сезон 2023 г. в результате расширенного обследования территорий природных очагов КР получено и исследовано 1435 биологических образцов, включая 380 образцов из Центрального Аксая (Ат-Башинское ПЧО, обследовано 80 тыс. га), 385 – из участка Энилчек-Кайанды (Каракольское ПЧО, обследовано 90 тыс. га), 315 – из Восточно-Алайского участка очаговости (Ошское ПЧО, обследовано 100 тыс. га), 355 – из всех четырех участков очаговости Таласского очага (Таласское ПЧО). В том числе весной и осенью 2023 г. в Таласском очаге получено 75 и 280 образцов соответственно. Методом ПЦР среди образцов из обследованного участка Сарыджазского автономного очага выявлено 3 положительные пробы, Таласского – 2. В биологических образцах из Аксайского и Алайского очагов положительных ПЦР-проб не выявлено. Положительные по результатам ПЦР пробы использованы для заражения биопробных животных. Из трех положительных в ПЦР образцов из Сарыджазского очага микробиологическими методами выделено три культуры *Y. pestis*. Два штамма – *Y. pestis* 107 и 133 – получены от серых сурков *Marmota baibacina* в урочище Чон-Карабел в Сарыджазском очаге, сектор 114407512(31), в мае 2023 г. и один штамм – *Y. pestis* 136 – получен там же от пищухи. Места выделения культур *Y. pestis* на территории Сарыджазского высокогорного автономного очага представлены на рис. 1.

Биохимические характеристики выделенных культур *Y. pestis*. По комплексу культурально-морфологических и иммунологических лабораторных тестов выделенные культуры принадлежали к виду *Y. pestis*. Изучение биохимических свойств показало, что они не ферментируют рамнозу, но активны в отношении сахарозы, мальтозы, лактозы, маннита, арабинозы. Штаммы также были способны к редукции нитратов. Эти данные свидетельствовали о том, что выделенные штаммы относились к основному подвиду (рамнозо-негативные), античному биовару (позитивны по ферментации глицерина и редукции нитратов) чумного микроба.

Молекулярно-генетическая идентификация штаммов *Y. pestis*. Для проведения молекулярно-генетической идентификации по принадлежности к подвидам, биоварам и филогенетическим линиям штаммов *Y. pestis* из природных очагов КР нами разработан способ, основанный на методе определения различий температур плавления продуктов ПЦР, отличающихся по одному нуклеотиду, с помощью анализа кривых плавления – HRM [9, 10]. Преимущество использования этого метода в полевых условиях заключается в отсутствии необходимости исполь-

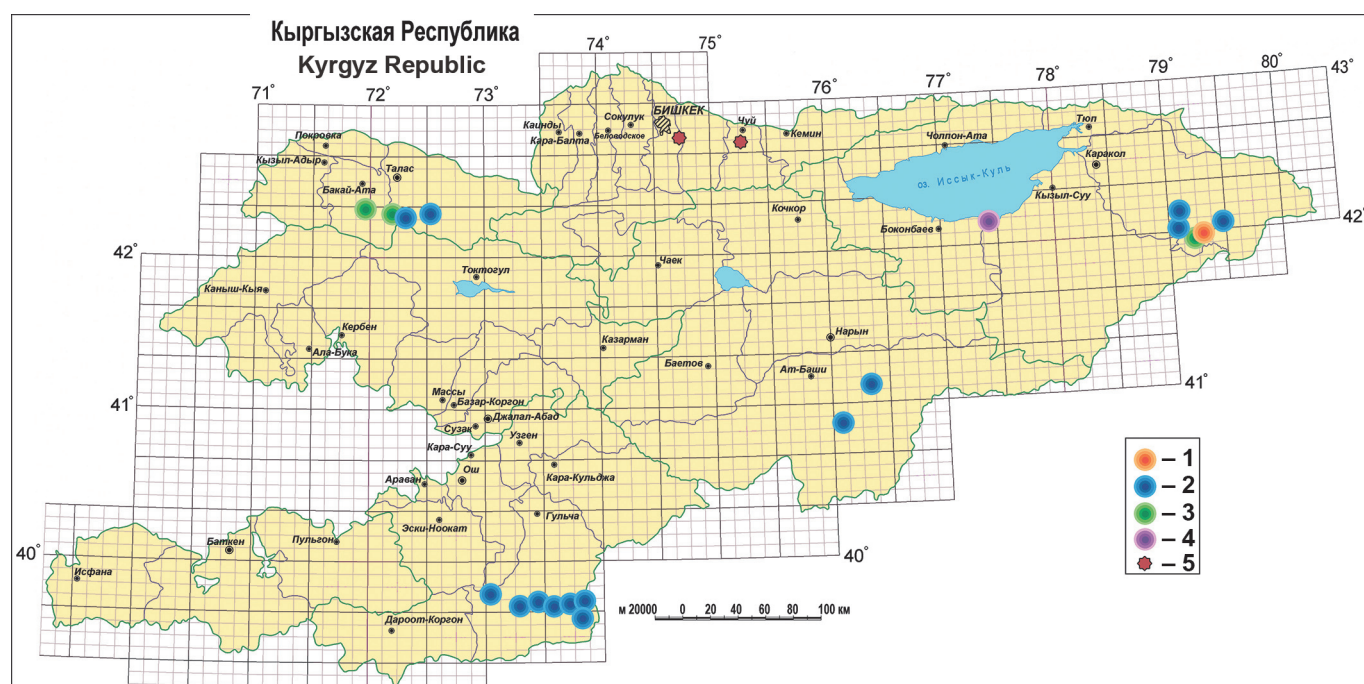


Рис. 1. Результаты обследования природных очагов чумы Кыргызской Республики с помощью современных технологий лабораторной диагностики. Цветными кружками отмечены сектора:

1 – выделение культур (оранжевый); 2 – положительные ИФА-пробы (синий); 3 – положительные ПЦР-пробы (зеленый); 4 – ранее реконструированный геном античного биовара, 120 г. н.э. (лиловый) [11]; 5 – ранее реконструированные геномы античного биовара 1338–1339 гг. (красный) [12]

Fig. 1. Results of survey of natural plague foci in the Kyrgyz Republic using modern laboratory diagnostic technologies. Sectors are marked with colored circles:

1 – isolation of cultures (orange); 2 – positive ELISA tests (blue); 3 – positive PCR tests (green); 4 – previously reconstructed genome of biovar antiqua, 120 AD (purple) [11]; 5 – previously reconstructed genomes of biovar antiqua, 1338–1339 AD (red) [12]

зования флуоресцентных зондов, что значительно удешевляет стоимость исследований и увеличивает сроки годности применения реактивов для проведения реакции. Для молекулярной идентификации штаммов из очагов чумы КР, относящихся к филогенетическим ветвям 0.ANT3 и 0.ANT5 античного биовара, 2.MED1 средневекового биовара и 0.PE4t таласского биовара центральноазиатского подвида, использованы как ранее сконструированные, так и вновь рассчитанные нами для этого исследования олигонуклеотидные праймеры [13–16]. Маркерные ДНК-мишени и последовательности праймеров приведены в табл. 1. В качестве ДНК-мишеней использовались делеции и полиморфные единичные нуклеотиды SNPs, маркерные для подвидов, биоваров и филогенетических ветвей. Для HRM-анализа использовали следующие мишени: делеции в межгенном пространстве *ilvN-ilvB* (45 п.н.) и в гене *terC* (89 п.н.) у основного подвида; делеция (24 п.н.) в межгенном пространстве *gcvT-visC* у средневекового биовара и делеция (33 т.п.н.) у филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биовара; делеция в гене *YPO2014* (72 п.н.) у таласского биовара центральноазиатского подвида; делеция в гене *YPO2071* (509 п.н.) у всех биоваров центральноазиатского подвида. Также для идентификации филогенетических ветвей 0.ANT5 и 0.ANT3 использовались маркерные SNP-мишени: SNP (C→A) в гене *metJ* у филогенетической ветви 0.ANT5; SNP (C→T) в гене *manX* у филогенетической ветви 0.ANT3 античного биовара.

Режимы амплификации подбирались эмпирическим путем для ДНК амплификатора Rotor-Gene Q 6plex (производство Qiagen). Температура отжига праймеров варьировала ($T_m=56-60\text{ }^{\circ}\text{C}$), как и количество циклов амплификации (35–40 циклов). Детекцию флуоресцентного сигнала осуществляли на этапе элонгации в присутствии интеркалирующего красителя Eva-Green I (ООО «Синтол», Россия). Диапазон температуры на этапе плавления (MeltA) для делеций составлял 50–99 $^{\circ}\text{C}$, для SNPs – 72–99 $^{\circ}\text{C}$. Наилучший режим определяли по максимальному количеству выхода специфического ПЦР-продукта. Для каждой ДНК-мишени ПЦР ставили в трех повторах совместно с контрольным образцом *Y. pestis* с известной филогенетической принадлежностью. Результат температуры плавления рассчитывался как среднее арифметическое. В качестве контролей применялась ДНК музейных штаммов соответствующих подвидов, биоваров и филогенетических ветвей.

Результаты проведенной идентификации приведены в табл. 2. Рис. 2 иллюстрирует результаты молекулярной идентификации штаммов *Y. pestis* 107, 133 и 136 с использованием ДНК-мишеней для дифференциации основного и неосновных подвидов (45del, 89del), центральноазиатского подвида (509), филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биовара (2.MED1) и филогенетической ветви 0.ANT5 античного биовара (0.ANT5wild, 0.ANT5mut).

Таблица 1 / Table 1

ДНК-мишени и праймеры для молекулярной идентификации штаммов *Y. pestis* из очагов чумы КР
Target DNA and primers for molecular identification of *Y. pestis* strains from plague foci of the Kyrgyz Republic

Подвид, биовар, филогенетическая линия Subspecies, biovar, phylogenetic lineage	ДНК-мишень, локализация и координаты по геному референсного штамма Target DNA, localization and coordinates across the genome of the reference strain	Канал детекции Detection channel	Последовательности праймеров Primer sequences
Дифференциация подвидов и биоваров с использованием маркерных делеций Differentiation of subspecies and biovars using marker deletions			
Основной подвид (п/в) Main subspecies (ssp.)	45del ¹ Делеция (45 п.н.) в межгенном пространстве <i>ilvN-ilvB</i> у основного п/в. 2579997–2580134 ¹ Deletion (45 bp) in the <i>ilvN-ilvB</i> intergenic space in the main ssp. 2579997–2580134	FAM	F: gtggatgagaaagtttacc R: atcacacctggatggttac
Основной п/в Main ssp.	89del ¹ Делеция (89 п.н.) в гене <i>terC</i> у основного п/в ¹ Deletion (89 bp) in the <i>terC</i> gene in the main ssp.	FAM	F: atgaaatgaccgacaacag R: gtctcactgggtgtattag
Средневековый биовар (б/в), 2.MED Medieval biovar (b/v), 2.MED	¹ med24 Делеция (24 п.н.) в межгенном пространстве <i>gcvT-visC</i> у средневекового б/в основного п/в. 996453–996622 Deletion (24 bp) in the <i>gcvT-visC</i> intergenic space in the medieval b/v of the main ssp. 996453–996622	FAM	F: gccagttgtgtctaaag R: cgcaacattcgcgcaaa
Средневековый б/в, 2.MED1 Medieval b/v, 2.MED1	² 2.MED1 Ген <i>YPN_2820</i> расположен в области делеции (33 т.п.н.) между генами <i>YPN_2804</i> и <i>YPN_2838</i> у ветви 2.MED1. 3161933–3195112 The <i>YPN_2820</i> gene is located in the deletion region (33 kb) between the <i>YPN_2804</i> and <i>YPN_2838</i> genes in the 2.MED1 branch. 3161933–3195112	FAM	F: agcggcactctctacgaaat R: tgactccattgaagacgtattg
Центральноазиатский п/в, 0.PE4 ssp. <i>central asiatica</i> , 0.PE4	¹ CA509 Делеция (509 п.н.) в гене <i>YPO2071</i> у центральноазиатского п/в. 2351984–2351475 Deletion (509 bp) in the <i>YPO2071</i> gene in the <i>central asiatica</i> ssp. 2351984–2351475	FAM	F: cggactgggtaataacaag R: cccgtgtctgtttctga
Таласский б/в центральноазиатского п/в, 0.PE4 Talas b/v of the <i>central asiatica</i> ssp. 0.PE4	¹ Tal72 Делеция (72 п.н.) в гене <i>YPO2412</i> у таласского б/в центральноазиатского п/в. 2714350–2714515 Deletion (72 bp) in the <i>YPO2412</i> gene in the talas b/v of the <i>central asiatica</i> ssp. 2714350–2714515	FAM	F: cgcaagagttagggtgga R: cctaccaagatcccacggc
Дифференциация филогенетических линий античного б/в с использованием маркерных SNPs методом аллель-специфических ПЦР Differentiation of phylogenetic lineages of b/v antiqua by allele-specific PCR using marker SNPs			
0.ANT5, дикий тип 0.ANT5, wild type	¹ 0.ANT5wild Отсутствие замены (C→A) в гене <i>metJ</i> в позиции генома 121618 Absence of a substitution (C→A) in the <i>metJ</i> gene at genome position 121618	FAM	F: ttctcgcgcttcgggagc R: cggcaagaaaagcaagcagg
0.ANT5, мутантный тип 0.ANT5, mutant type	¹ 0.ANT5mut Наличие SNP (C→A) в гене <i>metJ</i> в позиции генома 121618 Presence of SNP (C→A) in the <i>metJ</i> gene at genome position 121618	FAM	F: ttctcgcgcttcgggaga R: cggcaagaaaagcaagcagg
0.ANT3, дикий тип АС-ПЦР 0.ANT3, wild type AS-PCR	¹ 0.ANT3wild* Отсутствие замены (C→T) в гене <i>manX</i> в позиции генома 2003542 Absence of a substitution (C→T) in the <i>manX</i> gene at genome position 2003542	FAM	1758F: gctagataccagtaaaagtg 1758R: acgacctcatagttctctt 1758T/C_W: (FAM)cattaaacgggctaccac(RTQ1)
0.ANT3, мутантный тип АС-ПЦР 0.ANT3, mutant type AS-PCR	¹ 0.ANT3mut* Наличие SNP (C→T) в гене <i>manX</i> в позиции генома 2003542 Presence of SNP (C→T) in the <i>manX</i> gene at genome position 2003542	ROX	1758F: gctagataccagtaaaagtg 1758R: acgacctcatagttctctt 1758C/T_M: (ROX)cattaaacgggctactacc(BHQ2)

Примечания: * отмечены результаты, полученные с применением способа выявления однонуклеотидных замен с помощью ПЦР-ПВ в традиционном формате; ¹ координаты ДНК-мишени по геному *Y. pestis* CO92 (NC_003143.1); ² координаты ДНК-мишени по геному *Y. pestis* Nepal615 (NZ_ACNQ00000000).

Notes: * the results obtained applying the method of identifying single-nucleotide substitutions using RT-PCR in a conventional format are noted; ¹ coordinates of target DNA according to the *Y. pestis* genome CO92 (NC_003143.1); ² coordinates of target DNA according to the *Y. pestis* genome Nepal615 (NZ_ACNQ00000000).

Таблица 2 / Table 2

Молекулярная идентификация штаммов *Y. pestis*, выделенных в Сарыджазском высокогорном очаге в 2023 г. методом ПЦР-РВMolecular identification of *Y. pestis* strains isolated in the Sarydzhas high-mountain focus in 2023 using the RT-PCR method

ДНК-мишени Target DNA	Штаммы <i>Y. pestis</i> <i>Y. pestis</i> strains			
	107	133	136	Контрольный образец ДНК Control DNA sample
	Температура плавления продукта ПЦР (T _m) Melting temperature of the PCR product (T _m)			
Дифференциация подвидов и биоваров с использованием маркерных делеций Differentiation of subspecies and biovars using marker deletions				
45del	Положительный: T _m =87,5 °C Positive: T _m =87.5 °C	Положительный: T _m =87,5 °C Positive: T _m =87.5 °C	Положительный: T _m =87,5 °C Positive: T _m =87.5 °C	Отрицательный контроль: неосновной п/в: T _m =88,7 °C Положительный контроль: основной п/в: T _m =87,5 °C Negative control: non-main ssp.: T _m =88.7 °C Positive control: main ssp.: T _m =87.5 °C
89del	Положительный: T _m =83,5 °C Positive :T _m =83.5 °C	Положительный: T _m =83,5 °C Positive: T _m =83.5 °C	Положительный: T _m =83,5 °C Positive: T _m =83.5 °C	Отрицательный контроль: неосновной п/в: T _m =86,3 °C Положительный контроль: основной п/в: T _m =83,5 °C Negative control: non-main ssp.: T _m =86.3 °C Positive control: main ssp.: T _m =83.5 °C
med24	Отрицательный: T _m =92,2 °C Negative: T _m =92.2 °C	Отрицательный: T _m =92,2 °C Negative: T _m =92.2 °C	Отрицательный: T _m =92,2 °C Negative: T _m =92.2 °C	Положительный контроль 2.MED: T _m =92,7 °C Positive control 2.MED: T _m =92.7 °C
2.MED1	Отрицательный: T _m =84,8 °C Negative: T _m =84.8 °C	Отрицательный: T _m =84,8 °C Negative: T _m =84.8 °C	Отрицательный: T _m =84,8 °C Negative: T _m =84.8 °C	Положительный контроль 2.MED1: отсутствие кривой плавления Positive control 2.MED1: no melting curve
CA509	Отрицательный: T _m =88,2 °C Negative: T _m =88.2 °C	Отрицательный: T _m =88,2 °C Negative: T _m =88.2 °C	Отрицательный: T _m =88,2 °C Negative: T _m =88.2 °C	Положительный контроль 0.PE4: отсутствие кривой плавления Positive control 0.PE4: no melting curve
Tal72	Отрицательный: T _m =90,8 °C Negative: T _m =90.8 °C	Отрицательный: T _m =90,8 °C Negative: T _m =90.8 °C	Отрицательный: T _m =90,8 °C Negative: T _m =90.8 °C	Положительный контроль 0.PE4t: T _m =89 °C Positive control 0.PE4t: T _m =89 °C
Дифференциация филогенетических линий с использованием маркерных SNPs методом аллель-специфических ПЦР Differentiation of phylogenetic lineages using allele-specific PCR with marker SNPs				
0.ANT5wild	Отрицательный Negative	Отрицательный Negative	Отрицательный Negative	Отрицательный контроль 0.ANT5: отсутствие кривой плавления Положительный контроль 0.ANT3: T _m =90,3 °C Negative control 0.ANT5: no melting curve Positive control 0.ANT3: T _m =90.3 °C
0.ANT5mut	Положительный: T _m =83,5 °C Positive: T _m =83.5 °C	Положительный: T _m =83,5 °C Positive: T _m =83.5 °C	Положительный: T _m =83,5 °C Positive: T _m =83.5 °C	Положительный контроль 0.ANT5: T _m =83,5 °C Positive control 0.ANT5: T _m =83.5 °C
0.ANT3wild *	Положительный Positive	Положительный Positive	Положительный Positive	Положительный сигнал у штаммов дикого варианта Positive signal in wild variant strains
0.ANT3mut *	Отрицательный Negative	Отрицательный Negative	Отрицательный Negative	Положительный сигнал у штаммов 0.ANT3 Positive signal in 0.ANT3 strains

Примечание: * отмечены результаты, полученные с применением способа выявления однонуклеотидных замен с помощью анализа кривых плавления продуктов ПЦР-РВ.

Note: * the results obtained using the method of identifying single-nucleotide substitutions by high-resolution melting (HRM) curve analysis of RT-PCR products are noted.

Как следует из табл. 2, все три выделенные культуры – 103, 133 и 136 – показали себя единообразно и по результатам ПЦР совпадали по температуре плавления с контрольной культурой 0.ANT5 (рис. 2). В ПЦР-РВ в традиционном формате с праймерами и зондом на филогенетическую линию 0.ANT3 все три

исследуемых штамма дали отрицательный результат. С праймерами на участки делеций в 45 и 89 п.н. показана принадлежность исследуемых штаммов к основному подвиду *Y. pestis*. В то же время с праймерами на центральноазиатский подвид и таласский биовар этого подвида получен отрицательный ре-

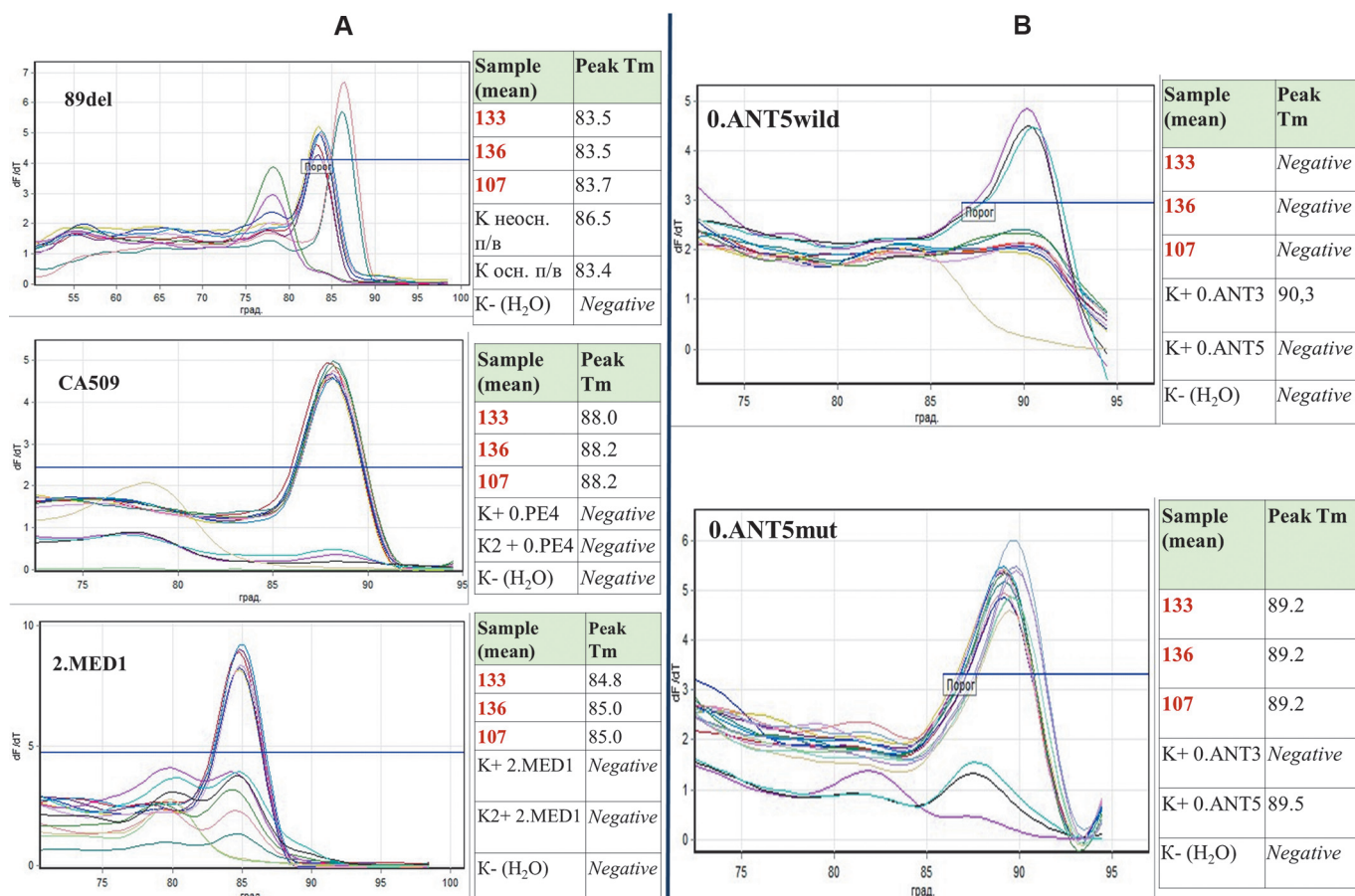


Рис. 2. Определение филогенетической принадлежности штаммов *Y. pestis* из Сарыджазского высокогорного очага (2023 г.) методом анализа кривых плавления продуктов ПЦР-РВ:

A – выделенные культуры; B – контрольная культура 0.ANT5 античного биовара

Fig. 2. Determination of phylogenetic appurtenance of *Y. pestis* strains from the Sarydzhas high-mountain focus (2023) through analyzing melting curves of RT-PCR products:

A – isolated cultures; B – control culture of 0.ANT5 branch, biovar antiqua

зультат. Отрицательным был результат и на средне-вековой биовар основного подвида. Таким образом, по комплексу проведенных исследований все три штамма относились к античному биовару основного подвида, филогенетической ветви 0.ANT5. Эти данные совпадали с результатами фенотипического анализа, а также с ранее полученными данными о распространении на территории Сарыджазского очага штаммов 0.ANT5. Таким образом, разработанный способ молекулярной идентификации штаммов *Y. pestis* из очагов чумы КР методом выявления однонуклеотидных замен с помощью анализа кривых плавления продуктов и комплекта разработанных праймеров показал свою эффективность для определения внутривидовой (подвиды, биовары, филогенетические ветви) принадлежности штаммов, полученных во время полевого сезона 2023 г. в природных очагах чумы КР. Разработанный способ может быть рекомендован для применения в дальнейших обследованиях полевого материала из природных очагов КР.

Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ штаммов *Y. pestis*. Для подтверждения результатов, полученных с помощью разра-

ботанного способа молекулярной идентификации штаммов *Y. pestis* из очагов КР, проведено полногеномное секвенирование трех выделенных в 2023 г. культур – 103, 133 и 136 – из Сарыджазского очага и выполнен их филогенетический анализ (рис. 3).

Как следует из приведенной на рис. 3 дендрограммы, штаммы *Y. pestis* 103, 133 и 136 вошли в ветвь 0.ANT5 вместе с другими ранее выделенными в Тянь-Шаньском очаге 0.ANT5 штаммами. Недавно мы сообщали, что от ранее существовавшей в XX в. популяции 0.ANT5 (на рис. 3 представлена штаммом *Y. pestis* 5M, Верхненарынский автономный очаг, 1958 г.) после длительного межэпизоотического периода в XXI в. отделились два новых клона, один из которых состоял из штаммов 2012–2020 гг. (*Y. pestis* 177, KM2079, KM2066, KM2073, KM2067, 49–50, KM2071, KM2080) (рис. 3, III), полученных в Сарыджазском и Верхненарынском очагах Тянь-Шаня. Второй недавно возникший клон состоял из штаммов 2020 г. из бассейна р. Койлу в Сарыджазском очаге (представлен на дендрограмме штаммом *Y. pestis* 80) (рис. 3, II). Как следует из дендрограммы, три выделенных в урочище Чон-Карабел в Сарыджазском очаге в 2023 г. штамма *Y. pestis* 103,

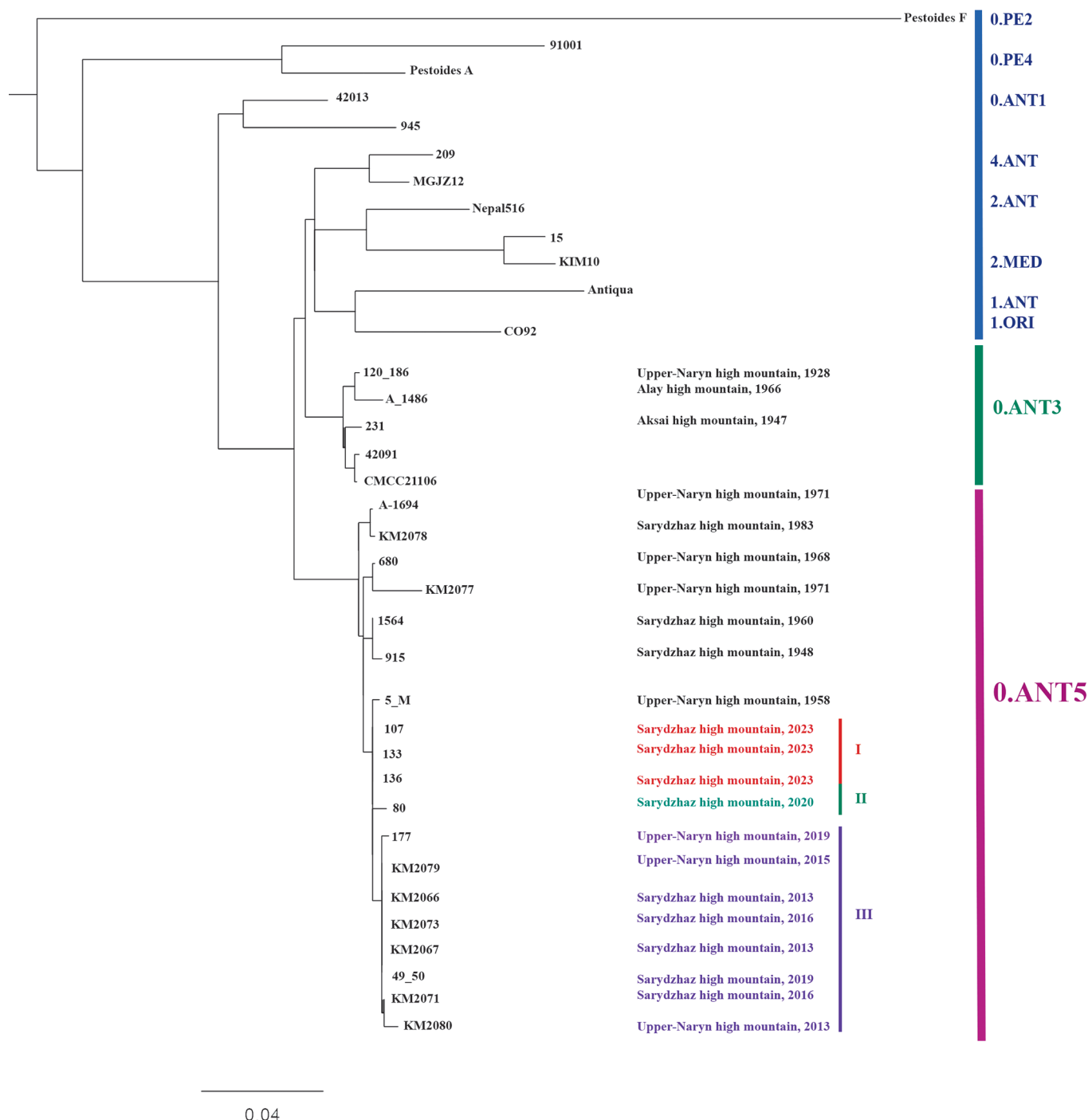


Рис. 3. Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* ветви 0.ANT5 античного биовара, выделенных в 2023 г. в Сарыджазском высокогорном очаге КР, по данным полногеномного секвенирования на основе 1527 коровых SNPs. Дендрограмму строили по алгоритму Maximum Likelihood с применением программы FastTree, встроенной в Snippy 4.6; модели GTR, подобранной в программе Jmodeltest2 с учетом AIC-критерия. Использовали 500 бутстреп-реплик. Визуализацию филогенетического дерева выполняли в программе FigTree v1.4.4. В качестве корня использовали штамм *Y. pestis* 620024 филогенетической линии 0.PE7, который на рисунке не представлен

Fig. 3. Phylogenetic analysis of *Y. pestis* strains of 0.ANT5 branch of the biovar antiqua, isolated in the Sarydzhas high-mountain focus of the Kyrgyz Republic in 2023, according to whole genome sequencing data based on 1527 core SNPs. The dendrogram was constructed using the Maximum Likelihood algorithm with the FastTree program built into Snippy 4.6; the GTR model selected in the Jmodeltest2 program taking into account the AIC criterion. 500 bootstrap replicas were used. Visualization of the phylogenetic tree was performed in the FigTree v1.4.4 software. *Y. pestis* strain 620024 of phylogenetic lineage 0.PE7, which is not shown in the figure, was used as a root

133 и 136 (рис. 3, I) не относятся к этим двум клонам, а принадлежат непосредственно к стволу популяции 0.ANT5, существовавшей здесь до межэпизоотического периода еще в 1958 г. Это свидетельствует о том, что микроочаги чумы сохранялись на этой территории в течение длительного времени и активизи-

ровались при наступлении благоприятных климатических условий.

Иммуноферментный анализ на выявление антител к фракции I *Y. pestis*. Также проведены развернутые исследования полевого материала 2023 г. на выявление антител к возбудителю чумы методом

ИФА. Для этого использовались смывы с грудной полости животных-носителей. Эти образцы исследовались с помощью тест-набора «ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*» (ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора) для детекции антител на фракцию 1 (Ф1) капсулы *Y. pestis* в соответствии с инструкцией к набору реагентов. При анализе 1435 проб обнаружено 86 положительных проб на наличие антител к фракции 1 капсулы *Yersinia pestis* в диагностическом титре 1/320. В результате установлено, что в полевом материале из Аксайского очага среди 320 проб количество положительных в ИФА было 2, среди 315 из Восточного Алая – положительных 71, среди 385 из Сарыджазского очага – положительных 11, среди 75 из Таласского очага, полученных весной, – положительных 2 и из 280, по-

лученных осенью, положительных проб не выявлено (табл. 3).

Места выявления положительных в ИФА проб представлены на рис. 1. Полученные данные (диагностический титр в ИФА 1/320 в 71 из 315 исследованных проб, 22,5 %) свидетельствуют о том, что на территории Восточного Алая в начале сезона прошла эпизоотия чумы на сурках. Грызуны с антигеном Ф1 встречались также на территории Сарыджазского очага – 11 из 385 исследованных проб (2,9 %), Аксайского очага – 2 из 380 проб (0,5 %) и Таласского очага в мае 2023 г. – 2 из 75 проб (2,7 %). Таким образом, ИФА является полезным диагностическим методом ретроспективного анализа напряженности эпизоотического процесса в очаге. Полученные данные также свидетельствуют о необходимости

Таблица 3 / Table 3

Результаты ИФА-анализа биологических проб полевого материала из природных очагов КР сезона 2023 г.
ELISA results for biological samples of field material from natural foci of the Kyrgyz Republic for the 2023-season

Природный очаг Natural focus	Количество проб Number of samples	Количество положительных проб Number of positive samples	Секторы очага Sectors of the focus
Аксайский Aksai	380	2	322431054,1 уч. Куйоо-Суу 322431054,1 Kujoo-Suu
			332431171,3 уч. Борду 332431171,3 Bordu
Алайский Alai	315	71	3514300331 ур. Катун-Арт 3514300331 Katyn-Art
			3514300343 ур. Туманчы 3514300343 Tumanchy
			3514300344 ур. Шарт 3514300344 Shart
			3514300433 ур. Айланма 3514300433 Ailanma
			3514300434 ур. Митир-Бел 3514300434 Mitir-Bel
			3514300433 ур. Чолок-Теке 3514300433 Cholok-Teke
			3514300343 ур. Калмак-Суу 3514300343 Kalmak-Suu
			3514301621 ур. Кальта-Булак 3514301621 Kal'ta-Bulak
Сарыджазский Sarydzhaz	385	11	3514300443 ур. Кок-Суу 3514300443 Kok-Suu
			114406344 Кайынды ур. Учкун грей 114406344 Kajyndy Uchkun grey
			114406333 ур. Сарлыташ 114406333 Sarlytash
Таласский (весна 2023 г.) Talas (spring 2023)	75	2	114406331 ур. Малый Талды-Суу Тез 114406331 Maly Taldy-Suu Tez
			114306211 ущ. Калба 114306211 Kalba
Таласский (осень 2023 г.) Talas (autumn, 2023)	280	–	–
Итого Total	1435	86	

более раннего выезда эпидотрядов для эпизоотического обследования территории Восточного Алая в Алайском высокогорном очаге. В целом результаты диагностического исследования полевого материала, полученного в 2023 г. в природных очагах КР, с помощью современных диагностических технологий свидетельствуют о продолжающейся активизации очагов чумы КР.

Перспективы палеогеномных исследований на территории КР. В рамках расширенного обследования территорий КР проведено рекогносцировочное обследование мест исторических захоронений, связанных со вспышками чумы. Ранее нами было показано, что в Тянь-Шаньском высокогорном очаге широко распространены штаммы древней филогенетической линии 0.ANT. Впервые обнаружена линия 0.ANT5, геном которой оказался наиболее близким геному штаммов Юстиниановой чумы (541–543 гг.) начала первой пандемии чумы [17, 18]. Из этого нами был сделан вывод, что первая пандемия чумы могла начаться на этой территории, что впоследствии подтверждено реконструкцией древнего генома *Y. pestis* из костных останков в захоронении того времени, найденном в Тянь-Шане [11]. В 2022 г. M.A. Spyrou *et al.* реконструировали геном из костных образцов, полученных русскими исследователями в конце XIX в. при раскопках средневековых кладбищ у г. Токмак (Буранинское) и «близ Пишпека» (современный г. Бишкек, Кара-Джигачское кладбище) в Чуйской долине Чуйской области, некоторые из которых оказались чумными [12]. Геном оказался непосредственным предшественником штаммов эпидемии «Черная смерть» (1348–1354 н.э.). Из этого был сделан вывод, что вторая пандемия чумы началась с этой территории. Ранее российский востоковед Д.А. Хвольсон написал, основываясь на текстах части надгробных эпитафий, что вторая пандемия чумы началась с местной вспышки чумы в 1338–1339 гг. и через торговые маршруты Великого шелкового пути достаточно быстро достигла средневековой Европы [19]. В то же время существуют и другие мнения о времени и месте возникновения второй пандемии чумы и о том, что первоначальная диверсификация ветви 0.ANT, предшествовавшая второй пандемии чумы, произошла ранее, не в XIV, а в XIII в., и была связана с территориальными экспансиями монголов [20, 21]. Для подтверждения предположения о том, что вторая пандемия чумы началась на Тянь-Шане, необходима реконструкция других геномов возбудителя этого периода. В настоящее время на территории средневекового городища Бурана, через которое проходил ранее Шелковый путь и известного как место раскопок конца XIX в. средневекового кладбища с чумными погребениями, сохранились остатки мавзолеев и погребений XII–XIV вв. [22, 23]. Эти места могут послужить источником информации, которая позволит подтвердить ранее полученные данные, что важно для выяснения закономерностей пространственно-временного рас-

пространения исторической чумы по торговым путям через Евразийские степи.

Природные очаги Кыргызстана остаются в настоящее время эпизоотически активными, о чем свидетельствуют факт выделения культур *Y. pestis* в Сарыджазском мезоочаге Тянь-Шаньского высокогорного очага в 2023 г., а также наличие на территории Восточного Алая в Алайском высокогорном очаге большого количества грызунов, в крови которых в диагностическом титре содержатся антитела к антигену Ф1. С учетом частого выделения культур *Y. pestis* в Сарыджазском и Верхненарынском мезоочагах Тянь-Шаньского высокогорного очага чумы можно говорить о наличии напряженного эпизоотического процесса на этих очаговых территориях КР.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Благодарность. Благодарим научного сотрудника Института истории, археологии и этнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики В.А. Кольченко за консультации по локализации археологических объектов на территории Кыргызстана.

Список литературы

1. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств. Калининград: РА Полиграфич; 2022. 348 с.
2. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Кадастр эпизоотических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 год). Саратов: ООО «Амирит»; 2016. 248 с.
3. Eroshenko G.A., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Oglodin Y.G., Kukleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzharparova A.K., Kutyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.
4. Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Кутырев В.В. Исторические и современные классификации возбудителя чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 4:14–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-14-22.
5. Абдикаримов С.Т., Ибрагимов Э.Ш., Эгембергенов Ч.Э. Современное эпизоотическое состояние природных очагов чумы Кыргызской Республики и мероприятия, направленные на обеспечение эпизоотического благополучия по чуме. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 2:45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-45-48.
6. Ерошенко Г.А., Джапарова А.К., Оглодин Е.Г., Альхова Ж.В., Куклева Л.М., Кузнецов А.А., Краснов Я.М., Абдикаримов С.Т., Кутырев В.В. Филогеография штаммов *Yersinia pestis* ветви 0.ANT, выделенных в Тянь-Шане и Памиро-Алае в XX–XXI веках. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:76–84. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-76-84.
7. Куклева Л.М., Джапарова А.К., Оглодин Е.Г., Нарышкина Е.А., Краснов Я.М., Кузнецов А.А., Фадеева А.В., Ерошенко Г.А., Бердиев С.К., Кутырев В.В. Комплексная характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в Сарыджазском и Верхненарынском высокогорных очагах в 2019–2020 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 2:114–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-114-122.
8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
9. Reed G.H., Kent J.O., Wittwer C.T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2007; 8(6):597–608. DOI: 10.2217/14622416.8.6.597.

10. Vossen R.H.A.M., Aten E., Roos A., den Dunnen J.T. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum. Mutat.* 2009; 30(6):860–6. DOI: 10.1002/humu.21019.

11. Damgaard P.B., Marchi N., Rasmussen S., Peyrot M., Renaud G., Korneliussen T., Moreno-Mayar J.V., Pedersen M.W., Goldberg A., Usmanova E., Baimukhanov N., Loman V., Hedeager L., Pedersen A.G., Nielsen K., Afanasiev G., Akmatov K., Aldashev A., Alpaslan A., Baimbetov G., Bazaliiskii V.I., Beisenov A., Boldbaatar B., Boldgiv B., Dorzhu C., Ellingvag S., Erdenebaatar D., Dajani R., Dmitriev E., Evdokimov V., Frei K.M., Gromov A., Goryachev A., Hakonarson H., Hegay T., Khacha-tryan Z., Khaskhanov R., Kitov E., Kolbina A., Kubatbek T., Kukushkin A., Kukushkin I., Lau N., Margaryan A., Merkyte I., Mertz I.V., Mertz V.K., Mijiddorj E., Moiyesev V., Mukhtarova G., Nurmukhanbetov B., Orozbekova Z., Panyushkina I., Pieta K., Smrčka V., Shevnina I., Logvin A., Sjögren K.G., Stölcová T., Taravella A.M., Tashbaeva K., Tkachev A., Tulegenov T., Voyakin D., Yepiskoposyan L., Undrakhbold S., Varfolomeev V., Weber A., Wilson Sayres M.A., Kradin N., Allentoft M.E., Orlando L., Nielsen R., Sikora M., Heyer E., Kristiansen K., Willerslev E. 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes. *Nature*. 2018; 557(7705):369–74. DOI: 10.1038/s41586-018-0094-2.

12. Spyrou M.A., Musralina L., Gneccchi Ruscone G.A., Kocher A., Borbone P.G., Khartanovich V.I., Buzhilova A., Djansugurova L., Bos K.I., Kühnert D., Haak W., Slavin P., Krause J. The source of the Black Death in fourteenth-century central Eurasia. *Nature*. 2022; 606(7915):718–24. DOI: 10.1038/s41586-022-04800-3.

13. Одинокоев Г.Н., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Краснов Я.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ подвидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы методом полимеразной цепной реакции. Патент РФ № 2552611, опублик. 10.06.2015. Бюл. № 16.

14. Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Макашова М.А., Балыкова А.Н., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Конструирование системы аллельспецифической ПЦР в режиме реального времени для определения филогенетической принадлежности штаммов *Yersinia pestis*. *Биотехнология*. 2022; 38(3):82–91. DOI: 10.56304/S0234275822030073.

15. Носов Н.Ю., Никифоров К.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ идентификации штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара с последующей дифференциацией по филогенетической принадлежности методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов. Патент РФ № 2705813, опублик. 12.11.2019. Бюл. № 32.

16. Морозов О.А., Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ идентификации *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* и одновременной дифференциации *Yersinia pestis* основного и центральноазиатского подвидов методом мультиплексной ПЦР. Патент РФ № 2737775, опублик. 02.12.2020. Бюл. № 34.

17. 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.

18. Feldman M., Harbeck M., Keller M., Spyrou M.A., Rott A., Trautmann B., Scholz H.C., Pfüffgen B., Peters J., McCormick M., Bos K., Herbig A., Krause J. A high-coverage *Yersinia pestis* genome from a sixth-century Justinianic plague victim. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(11):2911–23. DOI: 10.1093/molbev/msw170.

19. Хвольсон Д.А. Несторианские надписи из Семиречья. В кн.: Розен В.Р., редактор. Записки Восточного отделения Императорского Русского археологического общества. Т. 1. 1886. СПб.: Тип. Имп. Академии наук; 1887. С. 217–21.

20. Green M.H. The four Black Deaths. *Am. Hist. Rev.* 2020; 125(5):1601–31. DOI: 10.1093/ahr/rhaa511.

21. Fancy N., Green M.H. Plague and the fall of Baghdad (1258). *Med. Hist.* 2021; 65(2):157–77. DOI: <https://doi.org/10.1017/mdh.2021.3>.

22. Кольченко В.А. Припишпекское (Кара-Джигачское) средневековое христианское кладбище по данным архивных документов о раскопках 1886 года. В кн.: Религии Казахстана и Центральной Азии на Великом Шелковом пути: Материалы международной научно-практической конференции (Алматы, 12–13 июня 2017 г.). Алматы; 2017. С. 167–79.

23. Кольченко В.А. Христианское кладбище монгольского времени на городище Бурана (по данным архивных документов о раскопках 1886 года). В кн.: Бочаров С.Г., Ситдинов А.Г., редакторы. Генуэзская Хазария и Золотая Орда. Казань; Кишинев; 2019. Т. 2. С. 209–21.

References

1. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Atlas of Natural Plague Foci of Russia and Foreign Countries]. Kaliningrad: RA Poligrafich; 2022. 348 p.

2. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Cadastre of Epidemic and Epizootic Manifestations of Plague in the Territory of the Russian Federation and Former Soviet Union (1876–2016)]. Saratov: “Amirit” LLC; 2016. 248 p.

3. Eroshenko G.A., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzharparova A.K., Kutyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.

4. Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Kutyrev V.V. [Historical and modern classifications of the plague agent]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (4):14–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-14-27.

5. Abdikarimov S.T., Ibragimov E.Sh., Egembergenov Ch.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.

6. Eroshenko G.A., Dzharparova A.K., Oglodin E.G., Al'khova Zh.V., Kukleva L.M., Kuznetsov A.A., Krasnov Ya.M., Abdikarimov S.T., Kutyrev V.V. Phylogeny of *Yersinia pestis* strains belonging to 0.ANT branch, isolated in Tien-Shan and Pamir-Alai in XX–XXI centuries. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):76–84. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-76-84.

7. Kukleva L.M., Dzharparova A.K., Oglodin E.G., Naryshkina E.A., Krasnov Ya.M., Kuznetsov A.A., Fadeeva A.V., Eroshenko G.A., Berdiev S.K., Kutyrev V.V. [Complex characteristics of *Yersinia pestis* strains isolated in the Sarydzhas and Upper-Naryn high-mountain foci in 2019–2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (2):114–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-114-122.

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

9. Reed G.H., Kent J.O., Wittwer C.T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2007; 8(6):597–608. DOI: 10.2217/14622416.8.6.597.

10. Vossen R.H.A.M., Aten E., Roos A., den Dunnen J.T. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum. Mutat.* 2009; 30(6):860–6. DOI: 10.1002/humu.21019.

11. Damgaard P.B., Marchi N., Rasmussen S., Peyrot M., Renaud G., Korneliussen T., Moreno-Mayar J.V., Pedersen M.W., Goldberg A., Usmanova E., Baimukhanov N., Loman V., Hedeager L., Pedersen A.G., Nielsen K., Afanasiev G., Akmatov K., Aldashev A., Alpaslan A., Baimbetov G., Bazaliiskii V.I., Beisenov A., Boldbaatar B., Boldgiv B., Dorzhu C., Ellingvag S., Erdenebaatar D., Dajani R., Dmitriev E., Evdokimov V., Frei K.M., Gromov A., Goryachev A., Hakonarson H., Hegay T., Khacha-tryan Z., Khaskhanov R., Kitov E., Kolbina A., Kubatbek T., Kukushkin A., Kukushkin I., Lau N., Margaryan A., Merkyte I., Mertz I.V., Mertz V.K., Mijiddorj E., Moiyesev V., Mukhtarova G., Nurmukhanbetov B., Orozbekova Z., Panyushkina I., Pieta K., Smrčka V., Shevnina I., Logvin A., Sjögren K.G., Stölcová T., Taravella A.M., Tashbaeva K., Tkachev A., Tulegenov T., Voyakin D., Yepiskoposyan L., Undrakhbold S., Varfolomeev V., Weber A., Wilson Sayres M.A., Kradin N., Allentoft M.E., Orlando L., Nielsen R., Sikora M., Heyer E., Kristiansen K., Willerslev E. 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes. *Nature*. 2018; 557(7705):369–74. DOI: 10.1038/s41586-018-0094-2.

12. Spyrou M.A., Musralina L., Gneccchi Ruscone G.A., Kocher A., Borbone P.G., Khartanovich V.I., Buzhilova A., Djansugurova L., Bos K.I., Kühnert D., Haak W., Slavin P., Krause J. The source of the Black Death in fourteenth-century central Eurasia. *Nature*. 2022; 606(7915):718–24. DOI: 10.1038/s41586-022-04800-3.

13. Odinokov G.N., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Krasnov Ya.M., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [A method for subspecies differentiation of plague agent strains using polymerase chain reaction]. RF Patent No. 2552611, publ. 06/10/2015. Bull. No. 16.

14. Nikiforov K.A., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Makashova M.A., Balykova A.N., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Construction of an allele-specific real-time PCR system to determine the phylogenetic appurtenance of *Yersinia pestis* strains]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2022; 38(3):82–91. DOI: 10.56304/S0234275822030073.

15. Nosov N.Yu., Nikiforov K.A., Eroshenko G.A., Kutylev V.V. [A method for identifying *Yersinia pestis* strains of medieval biovar with subsequent differentiation by phylogenetic appurtenance using polymerase chain reaction with hybridization-fluorescent registration of results]. RF Patent No. 2705813, publ. 11/12/2019. Bull. No. 32.
16. Morozov O.A., Nikiforov K.A., Oglodin E.G., Eroshenko G.A., Kutylev V.V. A method for identifying *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* and simultaneous differentiation of *Yersinia pestis* main and Central Asian subspecies using multiplex PCR. RF Patent No. 2737775, publ. 12/02/2020. Bull. No. 34.
17. 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.
18. Feldman M., Harbeck M., Keller M., Spyrou M.A., Rott A., Trautmann B., Scholz H.C., Paffgen B., Peters J., McCormick M., Bos K., Herbig A., Krause J. A high-coverage *Yersinia pestis* genome from a sixth-century Justinianic plague victim. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(11):2911–23. DOI: 10.1093/molbev/msw170.
19. Khvol'son D.A. Nestorian inscriptions from Seven Rivers. In: Rosen V.R., editor. [Notes of the Eastern Branch of the Imperial Russian Archaeological Society. Vol. 1. 1886]. St. Petersburg: Publishing House of the Imperial Academy of Sciences; 1887. P. 217–21.
20. Green M.H. The four Black Deaths. *Am. Hist. Rev.* 2020; 125(5):1601–31. DOI: 10.1093/ahr/rhaa511.
21. Fancy N., Green M.H. Plague and the fall of Baghdad (1258). *Med. Hist.* 2021; 65(2):157–77. DOI: <https://doi.org/10.1017/mdh.2021.3>.
22. Kol'chenko V.A. [Pripishpek (Kara-Dzhigach) medieval Christian cemetery according to archival documents about excavations in 1886]. In: [Religions of Kazakhstan and Central Asia across the Great Silk Road: Materials of the International Scientific and Practical Conference (Almaty, June 12–13, 2017)]. Almaty; 2017. P. 167–79.
23. Kol'chenko V.A. [Christian cemetery of the Mongol era at the site of Burana (according to archival documents about excavations in 1886)]. In: Bocharov S.G., Sitdikov A.G., editors. [Genoese Khazaria and the Golden Horde]. Kazan; Kishinev; 2019. Vol. 2. P. 209–21.

Authors:

Berdiev S.K., Usenbaev N.T., Kebekbaeva N.T., Dzhaparova A.K., Yuldasheva A.M. Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic. 92, Skryabina St., Bishkek, 720005, Kyrgyz Republic. E-mail: rckooi@mail.ru.

Eroshenko G.A., Balykova A.N., Oglodin E.G., Katyshev A.D., Kuznetsov A.A., Fadeeva A.V., Kutylev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Mukanmetesen uulu Zh. At-Bashinsky Anti-Plague Department of the Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic. 4, M. Salymbekova St., At-Bashi, Naryn Region, Kyrgyz Republic.

Zhumashov D. Karakol Anti-Plague Department of the Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic. 114, Zhamansarieva St., Karakol, Kyrgyz Republic.

Razhapbaeva A.Sh. Osh Anti-Plague Department of the Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic. 1, Sh. Rustaveli St., Osh, Kyrgyz Republic.

Об авторах:

Бердиев С.К., Усенбаев Н.Т., Кебекбаева Н.Т., Джанпарова А.К., Юлдашева А.М. Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Кыргызской Республики. Кыргызская Республика, 720005, Бишкек, ул. Скрябина, 92. E-mail: rckooi@mail.ru.

Ерошенко Г.А., Балькова А.Н., Оглодин Е.Г., Катышев А.Д., Кузнецов А.А., Фадеева А.В., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Муканметэсен уулу Ж. Ат-Башинское противочумное отделение РЦКиООИ МЗ КР. Кыргызская Республика, Нарынская обл., Ат-Баши, ул. М. Салымбекова, 4.

Жумашиев Д. Каракольское противочумное отделение РЦКиООИ МЗ КР. Кыргызская Республика, Каракол, ул. Жамансариева, 114.

Разжапбаева А.Ш. Ошское противочумное отделение РЦКиООИ МЗ КР. Кыргызская Республика, Ош, ул. Ш. Руставели, 1.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-62-67

УДК 616.98:579.834.115

Н.В. Бренёва, Е.Ю. Киселева, М.Б. Шаракшанов, С.А. Борисов, С.Е. Будаева, С.В. Балахонов

Современные особенности изоляции и идентификации патогенных лептоспир в Сибири и на Дальнем Востоке*ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация*

В последнее время изоляция культур патогенных лептоспир в Российской Федерации – крайне редкое явление. **Цель** работы – обобщить опыт Иркутского противочумного института по выделению и идентификации культур лептоспир с 2011 г. **Материалы и методы.** Методом ПЦР и в реакции микроскопической агглютинации (РМА) исследован материал от восьми лиц с подозрением на лептоспироз и от 942 мелких млекопитающих (ММ), бактериологическим методом – от людей и 260 ММ. Для идентификации культур использовали бактериологический температурный тест, РМА, ПЦР, мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) и MALDI-TOF масс-спектрометрию (MS) с оригинальной базой белковых профилей лептоспир. В ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора получены полные геномы шести штаммов. **Результаты и обсуждение.** У людей на фоне приема антибиотиков не удалось изолировать лептоспиры, несмотря на положительные результаты ПЦР и РМА. От ММ выделено четыре культуры *Leptospira borgpetersenii* серогруппы *Javanica* и три *L. kirschneri* (*Grippityphosa*). Результаты идентификации методами MLST по схеме № 1 и MALDI-TOF MS идентичны. MLST *in silico* показало однотипность двух штаммов серогруппы *Grippityphosa* из Приморья и Хабаровска с профилем сиквенс-типов (ST) 110:100:94. У четырех штаммов серогруппы *Javanica* по схеме № 1 определяется ST 146, а по схемам № 2–3 выявлены уникальные одиночные нуклеотидные полиморфизмы. Таким образом, в 2012–2016 гг. в Сибири и на Дальнем Востоке изолировано семь культур патогенных лептоспир от носителей в природных очагах при их инфицированности от 12,0 до 48,9 %. Штаммы серогруппы *Javanica* отличаются особенностями MLST-профиля и более длительно приспособляются к питательным средам, чем штаммы серогруппы *Grippityphosa*.

Ключевые слова: лептоспиры, изоляция культур, идентификация, MLST, масс-спектрометрия.

Корреспондирующий автор: Бренёва Наталья Владимировна, e-mail: nbreneva@list.ru.

Для цитирования: Бренёва Н.В., Киселева Е.Ю., Шаракшанов М.Б., Борисов С.А., Будаева С.Е., Балахонов С.В. Современные особенности изоляции и идентификации патогенных лептоспир в Сибири и на Дальнем Востоке. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 4:62–67. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-62-67
Поступила 30.08.2023. Отправлена на доработку 18.10.2023. Принята к публ. 23.10.2023.

N.V. Breneva, E.Yu. Kiseleva, M.B. Sharakshanov, S.A. Borisov, S.E. Budaeva, S.V. Balakhonov

Modern Features of Pathogenic *Leptospira* Isolation and Identification in Siberia and the Far East*Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation*

Abstract. Recently, pathogenic *Leptospira* culture isolation is an extremely rare phenomenon in Russia. **The aim** of our work was to synthesize the lessons learned at the Irkutsk Anti-Plague Institute from *Leptospira* culture isolation and identification since 2011. **Materials and methods.** Material from eight individuals with suspected leptospirosis and from 942 small mammals (SM) was examined using PCR and microscopic agglutination test (MAT), from humans and 260 SM, applying bacteriological method. Bacteriological temperature test, MAT, PCR, MLST and MALDI-TOF mass spectrometry with the original *Leptospira* protein profiles base were used to identify cultures. Six complete genomes were generated at the Central Research Institute of Epidemiology of the Rosпотребнадзор. **Results and discussion.** *Leptospira* have not been isolated from humans against the background of taking antibiotics, despite the positive PCR and MAT results. Four cultures of *Leptospira borgpetersenii* of the *Javanica* serogroup and three *L. kirschneri* (*Grippityphosa*) have been isolated from SM. The results of identification using MLST scheme No. 1 and MALDI-TOF MS are identical. MLST *in silico* has shown the uniformity of two *Grippityphosa* serogroup strains from Primorie and Khabarovsk with a sequence-type (ST) profile 110:100:94. ST146 is determined in four *Javanica* serogroup strains according to scheme No. 1, and unique single nucleotide polymorphisms are detected according to schemes No. 2–3. Thus, in Siberia and the Far East, between 2012 and 2016, seven pathogenic *Leptospira* cultures were isolated from carriers in natural foci; carrier infection rate being 12.0–48.9 %. *Javanica* serogroup strains differ in the MLST profile characteristics and adapt to nutrient media for a longer time than *Grippityphosa* serogroup strains.

Key words: *Leptospira*, culture isolation, identification, MLST, mass spectrometry.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Bioethics: The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki within the framework of research project 005-1-12, which was approved by the Local Independent Ethical Committee of the Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East of the Federal Service for Surveillance on Consumers' Rights Protection and Human Wellbeing (protocol No. 2, dated September 25, 2011). Material from people was obtained from other institutions.

Acknowledgements: The team of authors expresses utmost gratitude to colleagues from the Central Research Institute of Epidemiology of the Rospotrebnadzor: Lyudmila S. Karan and Konstantin V. Kuleshov, for highly professional assembly of the genomes of pathogenic *Leptospira*.

Corresponding author: Natalya V. Breneva, e-mail: nbrenea@list.ru.

Citation: Breneva N.V., Kiseleva E.Yu., Sharakshanov M.B., Borisov S.A., Budaeva S.E., Balakhonov S.V. Modern Features of Pathogenic *Leptospira* Isolation and Identification in Siberia and the Far East. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:62–67. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-62-67

Received 30.08.2023. Revised 18.10.2023. Accepted 23.10.2023.

Breneva N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9207-7536>

Kiseleva E.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3965-9801>

Sharakshanov M.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1114-1795>

Borisov S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1781-0846>

Budaeva S.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3588-8145>

Balakhonov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Лептоспирозы – группа заболеваний, общих для человека и животных, отличающихся по клиническому течению и устойчивости возбудителя во внешней среде в зависимости от его вида и серовара [1].

В связи с трудностью выделения первые культуры лептоспир от человека были получены с использованием биологического метода в 1914–1915 гг., почти через 30 лет после описания заболевания. В СССР первая культура от больного получена в 1928 г. В эти же годы доказана роль мелких млекопитающих (ММ) как источников инфекции: в 1915–1916 гг. опубликованы данные по выделению возбудителя в Японии от полевки, серой и черной крысы, в 1929 г. – в России от серой крысы [2, 3].

Патогенные лептоспиры требовательны к питательным средам, отличаются медленным ростом (от пяти дней до трех месяцев) и чувствительны к любым внешним факторам, для них губительно высушивание, воздействие низких и высоких температур, солнечного света, УФ-облучения, дезинфектантов и других химических веществ, посторонней микрофлоры. Все это делает изоляцию и культивирование лептоспир крайне сложной задачей, требующей отдельной подготовки бактериологов и приготовления специальных питательных сред [4].

Пик выделения культур лептоспир в России пришелся на 50–60-е гг. прошлого века в связи с бурным развитием животноводства и ростом заболеваемости людей и животных [2, 3]. К сожалению, из-за сложностей культивирования и хранения большинство штаммов утрачено, в том числе коллекция Иркутского противочумного института. В настоящее время изоляция патогенных лептоспир – очень редкое явление [5].

Идентификация культур лептоспир представляет не меньше трудностей, чем их изоляция. Даже после укоренения геносистематики лептоспир основным таксоном остается серовар [6], определение которого требует наличия большого набора референтных штаммов, типовых сывороток или моноклональных антител, имеющих в наличии только в международном референс-центре в Нидерландах [7].

Природные очаги лептоспирозов распространены повсеместно, в Сибири и на Дальнем Востоке эндемичны по лептоспирозу Приморский и Хабаровский края, где высокие показатели заболеваемости населения лептоспирозами наблюдались до конца XX в. [8].

Цель работы – обобщить опыт выделения и идентификации культур лептоспир Иркутским противочумным институтом в 2011–2023 гг.

Материалы и методы

Все работы проводились в соответствии с требованиями биологической безопасности СП 1.3.2322-08 и СП 1.3.3118-13, транспортировка исследуемого материала – СП 1.2.036-95 (заменены на СанПиН 3.3686-21). Весь материал исследован в ПЦР и реакции микроскопической агглютинации (РМА). Кровь и/или мочу от трех больных лептоспирозом засеивали на питательные среды непосредственно «у постели больного», от двух больных с подозрением на лептоспироз и трех контактных с больными животными лиц – сразу после поступления в лабораторию института. Сделано 26 посевов от восьми человек.

Данные по отлову и исследованию мелких млекопитающих в природных очагах приведены в табл. 1. Бактериологическое исследование проводили в основном с материалом от зверьков, пойманных живыми. Всего сделан 741 посев от 260 ММ.

Отлов ММ проводили в соответствии с МУ 3.1.1029-01 (заменен на МР 3.1.0211-20) и МР 3.1.7.0250-21, использовали дилки Геро, конусы, канавки, капканы и живоловки. В Приморском крае силами Общества охотников и рыболовов производился отстрел ондатры. В Иркутске и в 2011 г. в Эхирит-Булагатском районе ММ отлавливали живыми и доставляли в лабораторию института, где производили вскрытие, отбор проб и посев почечных питательных сред. В 2012 г. в Эхирит-Булагатском районе ММ отлавливали всеми способами с постоянной проверкой орудий лова, вскрытие и посевы на питательные среды проводили в полевых условиях, затем материал доставляли в институт. В Приморском крае посевы проводили также в полевых условиях, инкубировали в термостате лаборатории ФБУЗ ЦГиЭ в Приморском крае или Спасской городской больницы, доставляли в лабораторию Приморской противочумной станции автотранспортом, затем в институт – авиатранспортом в термоконтейнерах. В Хабаровском крае ММ отлавливали в живоловки и доставляли в лабораторию Хабаровской противочумной станции, где осуществляли вскрытие, посев почечных и мочи из мочевого пузыря, если он был на-

Таблица 1 / Table 1

Результаты исследований проб от мелких млекопитающих
Results of studies of small mammals samples

Территория отлова ММ Territory of trapping small mammals (SM)	Период отлова ММ Period of trapping SM	Всего ММ / положительные в ПЦР, % Total number of SM / PCR positive, %	Количество ММ / количество посевов Number of SM / number of sown objects	Дата регистрации культур Date of culture registration
Иркутская область, Эхирит-Булагатский район Irkutsk Region, Ekhirit-Bulagatsky District	2011, сентябрь, октябрь 2011, September, October	28 / 39,3±9,2	12 / 48	Не выделены Not isolated
	2012, октябрь 2012, October	68 / 24,3±5,1	10 / 36	Не выделены Not isolated
Иркутск, микрорайон Ново-Ленино, болотно-озерный комплекс Irkutsk, Novo-Lenino microdistrict, Marsh-lake complex	2012, июль, август 2012, July, August	25 / 12,0±6,5	25 / 100	12 Dec 2012
	2013, июль, август 2013, July, August	22 / 31,8±9,9	22 / 88	Не выделены Not isolated
	2014, июль, август 2014, July, August	27 / 22,2±8,0	27 / 108	01 Dec 2014
	2015, июль, август 2015, July, August	14 / 28,6±12,1	14 / 56	Не выделены Not isolated
	2022, июль 2022, July	18 / 33,3±11,1	18 / 36	Не выделены Not isolated
Приморский край, Спасский район Primorsk Territory, Spassky District	2014, сентябрь, октябрь 2014, September, October	328 / 38,4±2,7	44 / 97	18 Dec 2014
	2016, октябрь 2016, October	88 / 48,9±5,3	15 / 30	27 Oct 2016
Хабаровск, пригород Khabarovsk, suburbs	2015, июль 2015, July	64 / 40,6±6,1	15 / 30	19 Aug 2015
Еврейская автономная область Jewish Autonomous Region	2015, июль 2015, July	64 / 21,9±5,2	30 / 49	Не выделены Not isolated
Приморский край Primorsk Territory	2016, июль, август 2016, July, August	71 / 12,7±4,0	13 / 28	Не выделены Not isolated
Иркутская область Irkutsk Region	2022, август 2022, August	125 / 18,4±3,5	15 / 35	Не выделены Not isolated

полнен, первичную инкубацию посевов в термостате, затем доставляли в институт авиатранспортом.

При работе с нуклеиновыми кислотами (НК) руководствовались МУ 1.3.2569-09. Для постановки ПЦР почки ММ размораживали непосредственно перед исследованием и готовили суспензии на гомогенизаторе Tissue Lyser LT (Qiagen). Экстракцию НК для ПЦР осуществляли с помощью набора «РИБО-преп», детекцию – методом ПЦР в реальном времени с тест-системой «АмплиСенс® *Leptospira*-FL» или тест-системой «ЛПС» для выявления патогенных лептоспир методом полимеразной цепной реакции (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) на амплификаторе Rotor-Gene Q (Qiagen).

Бактериологические и серологические исследования на лептоспироз выполняли в соответствии с МУ 3.1.1128-02. Материал от людей, корковое вещество почек и мочу ММ засеивали слепым способом в пробирки со средами Ферворта – Вольфа и ЕМЖН (Becton Dickinson). Посевы инкубировали при 28 °C и просматривали в темном поле микроскопа «Микмед-6 вар. СД» (ЛОМО, Санкт-Петербург) с окуляром 10x и объективом 20x один раз в неделю в течение двух-трех месяцев. Морских свинок 150–

200 г и хомячков 25–40 г заражали внутрибрюшинно 1,5–2 мл материала, выдерживали 21 день и производили посев коркового слоя почек. Кроме того, у морских свинок через 1–3 часа после заражения засеивали кровь из сердца. Всего поставлено 88 биопроб. Для удаления посторонней микрофлоры использовали метод фильтрации через шприц-насадки с диаметром пор фильтров 0,2 мкм.

Выделенные культуры лептоспир идентифицировали по патогенности с помощью культурального температурного теста и ПЦР, до серогруппы – методом РМА с «Набором сывороток групповых агглютинирующих лептоспирозных» (ФГУП «Армавирская биофабрика»). Для определения вида лептоспир применяли масс-спектрометрическое прямое белковое профилирование (MALDI-TOF MS) и мультилокусное сиквенс-типирование (MLST). Подготовку образцов проводили после предварительного концентрирования культур центрифугированием при 12100–17000 g в течение 5–15 мин для MALDI-TOF MS – по протоколу для изолированных колоний [9] с использованием набора «MALDI-TOF проба» (НПО «Литех»), MLST – в соответствии с общепринятой методикой [10]. Масс-спектрометрическую

идентификацию культур лептоспир осуществляли на приборе Microflex LT (Bruker Daltonics) с использованием программ Flex Control 3.3. и MALDI Biotyper 3.0, а также оригинальной базы референсных спектров лептоспир [11]. MLST по схеме № 1 [10] ставили с использованием набора для амплификации ДНК и синтезированных праймеров (ЗАО «Синтол»), Exonuclease I 20 ед/мкл, FaspAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase 1 ед/мкл (Thermo Scientific), набора реагентов BigDye® Terminator v1.1 (или 3.1) Cycle Sequencing Kit, амплификатора Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems), секвенатора ABI Prism 3500 XL (Applied Biosystems/Hitachi). Полученные нуклеотидные последовательности обрабатывали в программе VectorNTI (Invitrogen Corp.) и загружали на онлайн-платформу <http://pubmlst.org/leptospira/>, где определялся сиквенс-тип и вид микроорганизма [12]. Полногеномную ДНК выделяли с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Подготовка библиотек, секвенирование и сборка полных геномов проведены в ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Проведено MLST *in silico* [12]. Статистическая обработка результатов заключалась в вычислении средних значений и их ошибок.

Результаты и обсуждение

У больных лептоспирозом, несмотря на выявление специфических участков НК лептоспир в образцах мочи и крови, антител к лептоспирам серогрупп *Icterohaemorrhagiae* и *Tarassovi*, изолировать культуры лептоспир не удалось, вероятнее всего, из-за того, что обследование проводилось после начала лечения противомикробными препаратами. В 2021 г. у больного с подозрением на лептоспироз в посевах мочи через месяц инкубации были обнаружены подвижные спирохеты с характерной морфологией, ПЦР с культурой дала положительный результат, но при дальнейших пересевах рост лептоспир прекратился, культура не была идентифицирована. В 2022 г. у владельца собаки, умершей предположительно от лептоспироза, в моче при микроскопии обнаружены микроорганизмы, сходные по морфологии с лептоспирами, но ПЦР показала отсутствие специфических НК, при пересевах на питательные среды спирохеты не обнаружены.

Более успешными были попытки выделить культуры лептоспир от ММ в природных биотопах (табл. 1). Впервые в черте г. Иркутска в 2012 г. выделены две культуры на территории болотно-озерного комплекса микрорайона Ново-Ленино. Единичные лептоспиры в посевах обнаружены через месяц инкубации, для идентификации культур потребовалось несколько пассажей на животных и питательных средах для достижения достаточной концентрации микробных клеток, выделение культур зарегистрировано через четыре месяца после первичного посева. При других попытках изоляции культур в Иркутске

выделить еще одну культуру удалось только в 2014 г. В посевах материала из Эхирит-Булгатского района наблюдали единичные лептоспиры, но дальнейшие пассажи не дали результатов, у биопробных животных выявлены антитела к лептоспирам серогруппы *Icterohaemorrhagiae*.

В 2014 г. через две недели инкубации в посевах от пяти ММ, отловленных в Приморском крае, обнаружены единичные спирохеты с характерной морфологией и подвижностью. Выделение двух культур зарегистрировано через 2,5 месяца после первичного посева как через биопробу, так и прямым посевом на питательные среды. Обе культуры выделены в той же местности, что и в 1980–90-е гг. [13], в точке отлова ММ в окрестностях села Степное Спасского района. Интересно, что в 2016 г. культура лептоспир снова изолирована в этом же месте. В одном первичном посеве мочи от ПЦР-положительного ММ из Хабаровского края сразу по прибытии в институт обнаружили чистую культуру лептоспир, ее идентификация заняла около месяца. Лептоспиры были обнаружены в материале еще от двух ММ, но культуру выделить не удалось.

В 2022 г. в первичном посеве от ММ из Тулунского района обнаружены специфические НК и сходные по морфологии с лептоспирами микроорганизмы на фоне обильного роста посторонней микрофлоры. Культуру лептоспир не удалось очистить двойным пассажем на биопробных животных и фильтрацией через стерилизующие фильтры.

В изученных природных очагах у ММ определялись антитела к лептоспирам серогрупп *Autumnalis*, *Australis*, *Bataviae*, *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae*, *Hebdomadis*, *Javanica*, *Sejroe*, *Tarassovi*.

Результаты идентификации выделенных от ММ в Сибири и на Дальнем Востоке в 2012–2016 гг. культур лептоспир представлены в табл. 2. Всего выделено четыре культуры *L. borgpetersenii* серогруппы *Javanica* и три – *L. kirschneri* (*Grippotyphosa*). Процесс изоляции и идентификации культур занимал от трех недель до четырех месяцев (табл. 1) в зависимости от присутствия посторонней микрофлоры и скорости адаптации лептоспир к питательным средам. Результаты идентификации методами MLST по схеме № 1 и MALDI-TOF белкового профилирования полностью идентичны. MLST *in silico* по трем схемам показало однотипность двух штаммов серогруппы *Grippotyphosa* из Приморья и Хабаровска с профилем сиквенс-типов (ST) 110:100:94. У четырех штаммов серогруппы *Javanica* ST 146 определяется только по схеме № 1, а по схемам № 2–3 выявлены уникальные одиночные нуклеотидные полиморфизмы в различных локусах, которые полностью совпадают у выделенных в г. Иркутске штаммов и имеют отличия у штамма из Приморья.

Таким образом, культуры лептоспир от ММ в природных очагах лептоспирозов изолированы как на высокоэндемичных территориях (Приморский

Таблица 2 / Table 2

Характеристика культур лептоспир, выделенных от носителей в природных очагах
 Characterization of *Leptospira* cultures isolated from carriers in natural foci

Место выделения Site of isolation	Год Year	Серогруппа Serogroup	MLST [12]	MALDI-TOF MS [9]	№ штамма* Strain No. *	Полный геном The complete genome
Иркутск, болотно-озерный комплекс Irkutsk, Marsh-lake complex	2012	<i>Javanica</i>	ST 146 Scheme 1, GenBank ID KU955322, KU955323, KU955324, KU975042, KU975043, KU975044, KU975045; PubMLST ID 580; New ST Scheme 2-3	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	И1 (4-И)	GenBank CP102682.1–CP102683.1
	2012	<i>Javanica</i>	ST 146 Scheme 1 New ST Scheme 2-3	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	И2 (5-И)	GenBank CP102680.1–CP102681.1
	2014	<i>Javanica</i>	ST 146 Scheme 1, PubMLST ID 581 New ST Scheme 2-3	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	И3 (108-И)	GenBank CP112978.1–CP112979.1
Приморский край, село Степное Primorsk Territory, Stepnoe settlement	2014	<i>Grippotyphosa</i>	ST 110 Scheme 1, PubMLST ID 582	<i>Leptospira kirschneri</i>	И4 (50-ПК)	–
	2014	<i>Javanica</i>	ST 146 Scheme 1, PubMLST ID 583 New ST Scheme 2-3	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	И5 (34-ПК)	GenBank CP097464.1–CP097465.1
	2016	<i>Grippotyphosa</i>	ST 110 Scheme 1 ST 100 Scheme 2 ST 94 Scheme 3	<i>Leptospira kirschneri</i>	И7 (64-ПК)	GenBank CP112976.1–CP112977.1
Хабаровск Khabarovsk	2015	<i>Grippotyphosa</i>	ST 110 Scheme 1 ST 100 Scheme 2 ST 94 Scheme 3	<i>Leptospira kirschneri</i>	И6 (804-Khv)	GenBank CP125672.1–CP125673.1

Примечание: * номер штамма в коллекции Иркутского противочумного института, в скобках – оригинальное название.

Note: * strain number in the collection of the Irkutsk Anti-Plague Institute, original name – in parentheses.

и Хабаровский края), так и на территории с низкой эндемичностью (г. Иркутск). От людей культуру выделить не удалось, скорее всего, из-за раннего применения антибиотиков и позднего направления на лабораторное обследование.

Всего изолировано семь культур патогенных лептоспир от ММ при их общей инфицированности по результатам ПЦР от (12,0±6,5) до (48,9±5,3) %. ММ целесообразно отлавливать живыми, чтобы максимально сохранить жизнеспособность лептоспир. Кроме того, для успешной изоляции культур необходимо обеспечивать условия стерильности при посевах. Использование биопроб дает возможность избавиться от посторонней микрофлоры, накопить и подготовить культуры лептоспир для адаптации к питательным средам.

Успешность выделения культур лептоспир может зависеть и от серогруппы возбудителя. Известно, что лучше всего к условиям окружающей среды приспосабливаются лептоспиры серогруппы *Grippotyphosa*, которые наиболее часто удается изолировать от ММ в природных очагах на территории Российской Федерации [14]. Патогенные лептоспиры других серогрупп, и особенно *Icterohaemorrhagiae*, более требовательны к условиям культивирования [15], поэтому о доминирующей в очаге серогруппе возбудителя необходимо судить не только по изолированным культурам, но и по результатам РМА.

Выделенные штаммы серогруппы *Javanica* отличаются особенностями MLST-профиля и более

длительно приспосабливаются к питательным средам, чем штаммы серогруппы *Grippotyphosa*.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Биоэтика. Исследование проводилось согласно Хельсинской декларации в рамках темы НИР 005-1-12, которая одобрена Локальным независимым этическим комитетом ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 25.09.2011 № 2). Материал от людей получен из других учреждений.

Коллектив авторов выражает большую признательность коллегам из ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора Людмиле Станиславовне Карань и Константину Валерьевичу Кулешову за высокопрофессиональную сборку геномов патогенных лептоспир.

Список литературы

1. Haake D.A., Levett P.N. Leptospirosis in humans. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015; 387:65–97. DOI: 10.1007/978-3-662-45059-8_5.
2. Ананьин В.В. Лептоспирозы людей и животных. М.: Медицина; 1971. 352 с.
3. Терских В.И., Коковин И.Л. Лептоспирозные заболевания людей. М.: Медицина; 1964. 268 с.

4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
5. Samoilov A.E., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Evengard B., Zueva E.V., Panferova Y.A., Ostankova Y.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Kovalev E.V., Litovko A.R., Goncharov A.U., Semenov A.V., Khaifov K., Dedkov V.G. Lethal outcome of leptospirosis in southern Russia: Characterization of *Leptospira interrogans* isolated from a deceased teenager. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2020; 17(12):4238. DOI: 10.3390/ijerph17124238.
6. Paster B.J. Phylum XV. Spirochaetes Garrity and Holt 2001. In: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Springer, New York; 2010. Vol. 4. P. 471–566.
7. Leptospirosis Reference Centre. Typing with monoclonal antibodies [Электронный ресурс]. URL: <https://leptospira.amsterdamumc.org/leptospirosis-reference-centre/typing-with-monoclonal-antibodies/> [дата обращения 09.08.2023].
8. Онищенко Г.Г., Балахонов С.В., редакторы. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения при ликвидации последствий наводнения на Дальнем Востоке. Новосибирск: Наука-Центр; 2014. 648 с.
9. Rettinger A., Krupka I., Grünwald K., Dyachenko V., Fingerle V., Konrad R., Raschel H., Busch U., Sing A., Straubinger R.K., Huber I. *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiology*. 2012; 12:185. DOI: 10.1186/1471-2180-12-185.
10. Boonsilp S., Thaipadungpanit J., Amornchai P., Wuthiekanun V., Bailey M.S., Holden M.T.G., Zhang C., Jiang X., Koizumi N., Taylor K., Galloway R., Hoffmaster A.R., Craig S., Smythe L.D., Hartskeerl R.A., Day N.P., Chantratita N., Feil E.J., Aanensen D.M., Spratt B.G., Peacock S.J. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(1):e1954. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001954.
11. Бренёва Н.В., Самсонова А.П., Петров Е.М., Коновалова Ж.А., Остык А.С., Балахонов С.В. Спектры лептоспир для идентификации культур методом прямого белкового профилирования в программном обеспечении MALDI Biotyper (*Leptospira* protein spectra for MALDI Biotyper). Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2018621309, опубли. 16.08.2018. Бюл. № 8.
12. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 2018; 3:124. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
13. Макеев С.М., Марамонович А.С., Кондаков А.А., Чернявский В.Ф., Кузнецов А.П. Эпидемиологический мониторинг за лептоспирозами в регионах Сибири и Дальнего Востока. *Бюллетень ВШЦ СО РАМН*. 2004; 1(2):113–6.
14. Ананьина Ю.В., Самсонова А.П. Межвидовое и внутривидовое разнообразие лептоспир: филогенетические, таксономические и экологические аспекты. *Вестник РАМН*. 2000; 1:18–21.
15. Casanovas-Massana A., Pedra G.G., Wunder E.A. Jr, Diggle P.J., Begon M., Ko A.I. Quantification of *Leptospira interrogans* survival in soil and water microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018; 84(13):e00507-18. DOI: 10.1128/AEM.00507-18.
5. Samoilov A.E., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Evengard B., Zueva E.V., Panferova Y.A., Ostankova Y.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Kovalev E.V., Litovko A.R., Goncharov A.U., Semenov A.V., Khaifov K., Dedkov V.G. Lethal outcome of leptospirosis in southern Russia: Characterization of *Leptospira interrogans* isolated from a deceased teenager. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2020; 17(12):4238. DOI: 10.3390/ijerph17124238.
6. Paster B.J. Phylum XV. Spirochaetes Garrity and Holt 2001. In: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Springer, New York; 2010. Vol. 4. P. 471–566.
7. Leptospirosis Reference Centre. Typing with monoclonal antibodies. (Cited 09 Aug 2023). [Internet]. Available from: <https://leptospira.amsterdamumc.org/leptospirosis-reference-centre/typing-with-monoclonal-antibodies/>.
8. Onishchenko G.G., Balakhonov S.V., editors. [Ensuring the Sanitary and Epidemiological Well-Being of the Population during Elimination of Consequences of the Flooding in the Far East]. Novosibirsk: "Science Center"; 2014. 648 p.
9. Rettinger A., Krupka I., Grünwald K., Dyachenko V., Fingerle V., Konrad R., Raschel H., Busch U., Sing A., Straubinger R.K., Huber I. *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiology*. 2012; 12:185. DOI: 10.1186/1471-2180-12-185.
10. Boonsilp S., Thaipadungpanit J., Amornchai P., Wuthiekanun V., Bailey M.S., Holden M.T.G., Zhang C., Jiang X., Koizumi N., Taylor K., Galloway R., Hoffmaster A.R., Craig S., Smythe L.D., Hartskeerl R.A., Day N.P., Chantratita N., Feil E.J., Aanensen D.M., Spratt B.G., Peacock S.J. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(1):e1954. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001954.
11. Breneva N.V., Samsonova A.P., Petrov E.M., Kononova Zh.A., Ostyak A.S., Balakhonov S.V. [Leptospira spectra for culture identification by direct protein profiling in the MALDI Biotyper software (*Leptospira* protein spectra for MALDI Biotyper)]. Certificate of state registration of the database No. 2018621309, publ. 16 Aug 2018. Bul. No. 8.
12. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 2018; 3:124. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
13. Makeev S.M., Maramovich A.S., Kondakov A.A., Chernyavsky V.F., Kuznetsov A.P. [Epidemiological monitoring of leptospirosis in the regions of Siberia and the Far East]. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center, Siberian Branch of RAMS*. 2004; 1(2):113–6.
14. Anan'ina Yu.V., Samsonova A.P. [Interspecific and intraspecific diversity of *Leptospira*: phylogenetic, taxonomic and ecological aspects]. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2000; 1(1):18–21.
15. Casanovas-Massana A., Pedra G.G., Wunder E.A. Jr, Diggle P.J., Begon M., Ko A.I. Quantification of *Leptospira interrogans* survival in soil and water microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018; 84(13):e00507-18. DOI: 10.1128/AEM.00507-18.

Authors:

Breneva N.V., Kiseleva E.Yu., Sharakshanov M.B., Borisov S.A., Budueva S.E., 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:

Бренёва Н.В., Киселева Е.Ю., Шаракианов М.Б., Борисов С.А., Будаева С.Е., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

References

1. Haake D.A., Levett P.N. Leptospirosis in humans. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015; 387:65–97. DOI: 10.1007/978-3-662-45059-8_5.
2. Anan'ina V.V. [Human and Animal Leptospirosis]. Moscow: "Medicine"; 1971. 352 p.
3. Tersikh V.I., Kokovin I.L. [Leptospirosis Diseases in Humans]. Moscow: "Medicine"; 1964. 268 p.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: "Shiko"; 2013. 560 p.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-68-76

УДК 616.98:579.841.95(292.81)

П.А. Горюнова, Г.А. Ерошенко, А.Н. Балыкова, А.В. Коврижников, К.С. Шевченко,
Л.М. Куклева, Е.А. Нарышкина, Н.С. Червякова, В.В. Кутырев

MLVA25- и CRISPR-генотипы штаммов *Yersinia pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы

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

Цель работы – изучение генетического разнообразия и пространственно-временной структуры *Yersinia pestis* в Прикаспийском песчаном очаге чумы с использованием методов MLVA25- и CRISPR-типирования. **Материалы и методы.** В работе использовано 98 штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории Прикаспийского песчаного очага чумы в 1925–2015 гг. Полногеномное секвенирование выполняли на платформах Ion GeneStudio S5 System (ThermoFisher Scientific) и MGI (DNBSEQ-G50RS). Фрагментное секвенирование проводили с помощью ABI PRISM 3500XL. Поиск VNTR- и CRISPR-локусов с последующим выравниванием нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе MEGA X. Полученные последовательности вносили в созданную базу данных в программе Bionumerics v7.6 (Applied Maths). Построение филогенетического дерева осуществляли методом UPGMA. **Результаты и обсуждение.** По результатам проведенного MLVA25- и CRISPR-анализа 98 штаммов *Y. pestis* разделились на 60 генотипов (CS1 – CS60). Выявлена вариабельность по 23 VNTR-локусам. Описаны 7 новых CRISPR-спейсеров: 5 – в *YPa* и 2 – в *YPb* (размер – 31–33 п.н., GC-состав – 34–58 %). Описанные спейсеры получили названия a108, a109, a110, a111, a112, b53, b54. Выявлена взаимосвязь изменения копийности VNTR-локусов в зависимости от места и времени выделения штаммов. Полученные данные могут быть использованы для проведения молекулярно-генетической паспортизации территории Прикаспийского песчаного очага чумы и для изучения направлений и закономерностей эволюции и пространственно-временной циркуляции популяций *Y. pestis* в очагах чумы Прикаспия.

Ключевые слова: чума, штаммы *Yersinia pestis*, Прикаспийский песчаный очаг, MLVA- и CRISPR-генотипирование.

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

Для цитирования: Горюнова П.А., Ерошенко Г.А., Балыкова А.Н., Коврижников А.В., Шевченко К.С., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Червякова Н.С., Кутырев В.В. MLVA25- и CRISPR-генотипы штаммов *Yersinia pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:68–76. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-68-76

Поступила 28.11.2023. Принята к публ. 01.12.2023.

P.A. Goryunova, G.A. Eroshenko, A.N. Balykova, A.V. Kovrizhnikov, K.S. Shevchenko,
L.M. Kukleva, E.A. Naryshkina, N.S. Chervyakova, V.V. Kutyrev

MLVA25 and CRISPR Genotypes of *Yersinia pestis* Strains from the Caspian Sandy Plague Focus

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

Abstract. The aim of the work was to study the genetic diversity and spatial-temporal structure of *Yersinia pestis* in the Caspian sandy plague focus using MLVA25 and CRISPR typing methods. **Materials and methods.** 98 *Y. pestis* strains isolated in the territory of the Caspian sandy plague focus in 1925–2015 were used in the study. Whole genome sequencing was performed on Ion GeneStudio S5 System (ThermoFisher Scientific) and MGI (DNBSEQ-G50RS) platforms. Fragment sequencing was conducted using “ABI PRISM 3500XL”. The search for VNTR and CRISPR loci with subsequent alignment of nucleotide sequences was carried out in the MEGA X program. The obtained sequences were entered into the created database in the Bionumerics v7.6 (Applied Maths) software. The phylogenetic tree was constructed using the UPGMA method. **Results and discussion.** According to the results of MLVA25 and CRISPR analysis, 98 *Y. pestis* strains are divided into 60 genotypes (CS1 – CS60). Variability by 23 VNTR loci has been discovered. 7 new CRISPR spacers are described: 5 in *YPa* and 2 in *YPb* (size 31–33 bp, GC composition 34–58 %). The described spacers are designated as a108, a109, a110, a111, a112, b53, b54. The interrelation of changes in the copy number of VNTR loci depending on the place and time of isolation of strains has been revealed. The data obtained can be used to carry out molecular-genetic certification of the territory of the Caspian sandy plague focus and to study the routes and patterns of evolution and spatiotemporal circulation of *Y. pestis* populations in the Caspian plague foci.

Key words: plague, *Yersinia pestis* strains, Caspian sandy focus, MLVA and CRISPR genotyping.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

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

Citation: Goryunova P.A., Eroshenko G.A., Balykova A.N., Kovrizhnikov A.V., Shevchenko K.S., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Chervyakova N.S., Kutyrev V.V. MLVA25 and CRISPR Genotypes of *Yersinia pestis* Strains from the Caspian Sandy Plague Focus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2023; 4:68–76. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-68-76

Received 28.11.2023. Accepted 01.12.2023.

Goryunova P.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6522-2606>
Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>
Balykova A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3766-7979>
Kovrizhnikov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7752-6321>
Shevchenko K.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3170-9827>

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 очаг чумы занимает западную часть Прикаспийской низменности вдоль берега Каспийского моря от Волги до Терека. Административно очаг располагается в Астраханской области, республиках Калмыкия и Дагестан, Чеченской Республике и Ставропольском крае. На основании эколого-эпизоотологических характеристик территория Прикаспийского песчаного очага подразделена на пять ландшафтно-экологических районов (ЛЭР): Приволжские пески, Ильменно-Придельтовый район, Приморский район, Черные земли, Терско-Кумское междуречье. Эпидемические проявления в Прикаспийском песчаном очаге регистрировали в 1923–1948 гг. и в 1979 г. Штаммы *Yersinia pestis* выделяли от людей с различной формой чумы: бубонной, легочной, септической. Эпизоотии на территории очага регистрировали в 1924–1925, 1929–1931, 1935–1938, 1946–1954 гг. После 25-летнего межэпизоотического периода в 1979 г. отмечена резкая активизация очага, и в последующий период эпизоотии чумы регистрировали здесь практически ежегодно с выделением большого числа культур *Y. pestis* [1]. Штаммы, полученные на территории Прикаспийского очага, относятся к средневековому биовару основного подвида *Yersinia pestis* subspecies *pestis*, филогенетической ветви 2.MED1 [2]. Это высоковирулентные и эпидемически значимые штаммы, которые были этиологическими агентами вспышек и отдельных случаев чумы на территории очага в первой половине XX в. Штаммы *Y. pestis* филогенетической ветви 2.MED1 генетически однородны, что затрудняет их разделение по времени и региону выделения.

В настоящее время для внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* используют различные методы молекулярно-генетического типирования. Одним из доступных методов, обладающим высоким разрешением в отношении возбудителя чумы, является метод мультилокусного анализа VNTR-последовательностей – MLVA (от англ. multiple loci VNTR analysis). VNTR (от англ. variable number tandem repeats) – варибельное число tandemных повторов – участки генома с повторяющейся несколько раз короткой нуклеотидной последовательностью. Ввиду высокой частоты возникновения мутаций по VNTR-локусам (от $8,5 \cdot 10^{-6}$ до $3,7 \cdot 10^{-4}$ мутаций на поколение) метод MLVA-типирования обладает высокой дискриминационной способностью и эффективностью по отношению к штаммам *Y. pestis*, выделенным на одной географической территории [3, 4].

CRISPR (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – кластеризованные короткие палиндромные повторы с регулярными интервалами, состоят из повторов ДНК, разделенных неповторяющимися элементами, или «спейсерами»,

которые обычно представлены фрагментами чужеродных генетических элементов (бактериофагов или плазмид). Эти локусы и белки Cas (CRISPR-ассоциированные белки) образуют адаптивную иммунную систему, которая защищает бактерии от вторжения фагов и плазмид, а также участвует в механизмах клеточной регуляции [5, 6]. Геном *Y. pestis* содержит три CRISPR-локуса, называемых *YPa* (*YP1*), *YPb* (*YP2*) и *YPc* (*YP3*), в настоящее время сообщается о 173 спейсерных последовательностях [7–10]. Использование нескольких методов типирования позволяет установить связь между штаммами *Y. pestis*, выделенными из различных очагов чумы.

Целью работы является изучение генетического разнообразия и пространственно-временной структуры *Y. pestis* в Прикаспийском песчаном очаге чумы с использованием методов MLVA25- и CRISPR-типирования.

Материалы и методы

В работе использованы 98 штаммов *Y. pestis*, выделенных в Прикаспийском песчаном очаге в период с 1925 по 2015 г. Среди них 15 штаммов первой половины XX в. (1925–1947 гг.). Они получены от малого суслика *Spermophilus pygmaeus* (7 штаммов), домовой мыши *Mus musculus* (2 штамма), верблюда (1 штамм) и людей (5 штаммов). Штаммы *Y. pestis* второй половины XX – начала XXI в. (1979–2015 гг.) выделены от полуденной песчанки *Meriones meridianus* (37 штаммов) и ее блох (10 штаммов), гребенщиковой песчанки *Meriones tamariscinus* (6 штаммов) и ее блох (4 штамма), малого суслика *S. pygmaeus* (7 штаммов) и его блох (7 штаммов), домовой мыши *M. musculus* (4 штамма) и ее блох (2 штамма), серого хомячка *Cricetulus migratorius* (1 штамм) и его блох (2 штамма), обыкновенной полевки *Microtus arvalis* (1 штамм), ондатры *Ondatra zibethicus* (1 штамм), степного хорька *Mustela eversmanii* (1 штамм).

Штаммы *Y. pestis* выращивали при температуре 28 °C в течение 24–48 ч на агаре LB и в бульоне LB. Получение геномной ДНК *Y. pestis* осуществляли с помощью набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Данные для проведения MLVA25- и CRISPR-типирования собраны путем анализа результатов полногеномного и фрагментного секвенирования. Полногеномное секвенирование проводили на платформах Ion GeneStudio S5 System (ThermoFisher Scientific, США) и MGI (DNBSEQ-G50RS, Китай). Фрагментное секвенирование проводили с помощью ABI PRISM 3500XL (Applied Biosystems, США) при амплификации участков генома методом ПЦР с использованием пар праймеров, описанных ранее [7, 11, 12]. Поиск VNTR-локусов и последующее вы-

равнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA X. Количественный подсчет тандемных повторов выполняли по 25 VNTR-локусам в программе Tandem Repeats Finder 4.09 [13]. Поиск CRISPR-локусов и последующее выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA X. Полученные последовательности сравнивали с опубликованными данными для идентификации спейсеров CRISPR [9, 10]. Для спейсеров, впервые обнаруженных в каждом локусе CRISPR, проведен анализ нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритма BLAST в базе данных Gene Bank NCBI (<http://blast.ncbi>). Полученные числовые значения и нуклеотидные последовательности вносили в созданную в программе Bionumerics v7.6 (Applied Maths, Бельгия) базу данных для их последующей систематизации, хранения и проведения биоинформационного анализа. Построение филогенетического дерева для оценки родства штаммов осуществляли методом UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages, невзвешенная попарная группировка с усреднением). Для оценки дискриминирующей способности метода рассчитывали индекс разнообразия Хантера – Гастона (HGDI, Hunter – Gaston discriminatory index) [14]. Для оценки аллельного полиморфизма VNTR-локусов использовали индекс разнообразия PIC (polymorphism information content) [15].

Результаты и обсуждения

Проведено MLVA25- и CRISPR-типирование 98 штаммов *Y. pestis*, выделенных в 1925–2015 гг. на территории Прикаспийского песчаного очага чумы, в результате которого исследуемые штаммы разделились на 60 генотипов (индекс разнообразия HGDI=0,977), названных CS1 – CS60 (рисунок). Из них 46 были уникальными (т.е. обнаруживались только у одного штамма в изученной выборке), 12 (генотипы CS1, CS5, CS8, CS28, CS29, CS31, CS34, CS35, CS38, CS40, CS45, CS60) объединяли в себе от 2 до 4 штаммов, в состав двух (генотипы CS10, CS36) входило 9 штаммов.

При анализе изменчивости VNTR-локусов выявлена вариабельность по 23 локусам: *yp0120ms01*, *yp1290ms04*, *yp1935ms05*, *yp2769ms06*, *yp2916ms07*, *yp3057ms09*, *yp0559ms15*, *yp1814ms20*, *yp1895ms21*, *yp4042ms35*, *yp4425ms38*, *yp0581ms40*, *yp0718ms41*, *yp1018ms44*, *yp1108ms45*, *yp1335ms46*, *yp3060ms56*, *yp4280ms62*, *yp1118ms69*, *yp1580ms70*, *yp1925ms71*, *yp3236ms73*, *yp3245ms74*, – в то время как по оставшимся двум локусам: *yp2058ms51*, *yp2612ms54* – все исследуемые штаммы были идентичными (табл. 1, рисунок). Индекс разнообразия PIC варьировался от 0 до 0,678. Наибольшее количество аллелей наблюдалось в локусах *yp2769ms06*, *yp3057ms09*, *yp1335ms46*, *yp3060ms56*, *yp4280ms62*, *yp1580ms70*.

В результате проведенного CRISPR-анализа штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного оча-

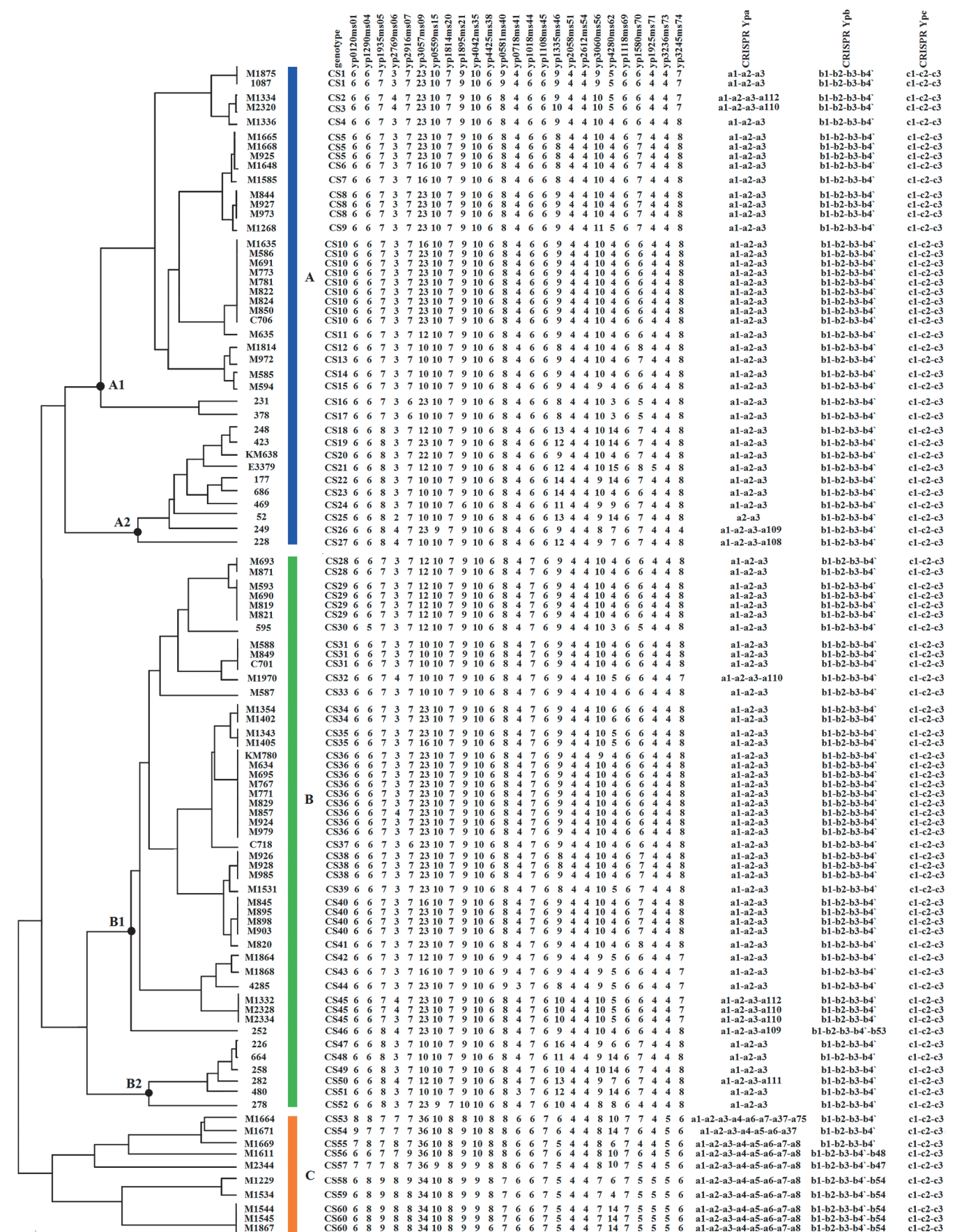
га чумы обнаружено 26 спейсеров. Нами выявлены вставки и делеции спейсерных последовательностей в локусах *YPa*, *YPb*, в то время как по локусу *YPc* все исследуемые штаммы были идентичными. Всего в штаммах *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы обнаружено 7 новых спейсеров: 5 – в *YPa* и 2 – в *YPb*. Их длина составляет от 31 до 33 п.н., а GC-состав варьирует в пределах 34–58 %. Впервые описанные спейсеры получили названия a108, a109, a110, a111, a112, b53, b54. Их характеристика представлена в табл. 2.

Новые спейсеры имеют гомологичные протоспейсерам последовательности в профаге *YPO2096~YPO2135* в геноме штамма CO92 (NCBI GenBankID AL590842.1). Недавно было показано, что профаг *YpfΦ* (*YPO2271~YPO2281* в геноме CO92) был стабилизирован в штаммах биовара *orientalis* и нестабильно присутствовал в некоторых штаммах трех других биоваров в качестве эписомы [16, 17]. Взаимодействие между *YpfΦ* и *Y. pestis* могло оставить некоторые следы в локусах CRISPR, однако ни один из идентифицированных спейсеров у изученных штаммов из Прикаспийского песчаного очага не имеет гомолога в *YpfΦ*.

Три локуса CRISPR присутствовали во всех изученных штаммах, а количество аллелей, наблюдаемых в *YPa*, *YPb* и *YPc*, составило 10, 5, 1 соответственно (табл. 3). *YPa* является наиболее полиморфным локусом CRISPR у *Y. pestis*, за которым следуют *YPb* и *YPc*, что согласуется с предыдущими результатами [7].

Большинство штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы имеют идентичный CRISPR-профиль, представленный спейсерами *YPa* a1-a2-a3, *YPb* b1-b2-b3-b4', *YPc* c1-c2-c3. Этот массив спейсеров уже был определен как CRISPR-профиль для штаммов средневекового биовара [8]. Однако часть исследуемых штаммов из Прикаспийского песчаного очага чумы имеют делецию спейсера в локусе *YPa* или же удлиненные массивы спейсеров в локусах *YPa* и *YPb*. Ранее T. Barrangou *et al.* предположили, что делеции происходят в результате гомологичной рекомбинации между повторами CRISPR [18]. Мы также идентифицировали вставки спейсеров, специфичные как для группы, так и для единичных штаммов из Прикаспийского песчаного очага чумы (табл. 3).

Большинство (78 %) изученных штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы имеют CRISPR-профиль, характерный для штаммов средневекового биовара. Однако штамм 52 (1925, *S. pygmaeus*) имел делецию a1 спейсера в локусе *YPa*. Для ряда штаммов, выделенных как в первой половине XX в., так и во второй половине XX – начале XXI в. на территории Черных земель, Терско-Кумского междуречья и Приморского района от носителей, переносчиков и людей, характерно наличие дополнительных (ранее не описанных в литературе) спейсеров: a108, a109, a110, a111, a112,



Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы по данным MLVA25- и CRISPR-типирования. Дендрограмма построена методом UPGMA в программе Bionumerics 7.6.3

Phylogenetic analysis of *Y. pestis* strains from the Caspian sandy plague focus according to the results of MLVA25 and CRISPR typing. The dendrogram was constructed using the UPGMA method in the Bionumerics 7.6.3 program

Таблица 1 / Table 1

Характеристика VNTR-локусов штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага
 Characteristics of VNTR loci of *Y. pestis* strains from the Caspian sandy focus

Локус Locus	Длина повтора, п.н. Repeat size, bp	Размер ампликона, п.н. Allele size range, bp	Количество копий VNTR Number of VNTR copies	Индекс полиморфизма Polymorphism information content
<i>yp0120ms01</i>	18	210–264	6, 7, 8, 9	0,079
<i>yp1290ms04</i>	17	179–230	5, 6, 7, 8	0,188
<i>yp1935ms05</i>	17	257–291	7, 8, 9	0,368
<i>yp2769ms06</i>	60	245–605	2, 3, 4, 7, 8	0,366
<i>yp2916ms07</i>	10	164–194	6, 7, 8, 9	0,172
<i>yp3057ms09</i>	18	286–736	10, 12, 16, 22, 23, 34, 36	0,678
<i>yp0559ms15</i>	15	221–237	9, 10	0,039
<i>yp1814ms20</i>	15	238–253	7, 8	0,183
<i>yp1895ms21</i>	18	224–296	6, 8, 9, 10	0,059
<i>yp4042ms35</i>	15	204–219	9, 10	0,114
<i>yp4425ms38</i>	16	201–233	6, 8	0,116
<i>yp0581ms40</i>	17	214–248	7, 8, 9	0,188
<i>yp0718ms41</i>	17	166–217	3, 4, 6	0,219
<i>yp1018ms44</i>	17	233–254	6, 7	0,499
<i>yp1108ms45</i>	12	149–161	6, 7	0,188
<i>yp1335ms46</i>	7	112–189	5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16	0,621
<i>yp2058ms51</i>	18	207	4	0,00
<i>yp2612ms54</i>	22	281	7	0,00
<i>yp3060ms56</i>	16	220–284	7, 8, 9, 10, 11	0,458
<i>yp4280ms62</i>	9	97–205	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15	0,646
<i>yp1118ms69</i>	16	163–179	6, 7	0,183
<i>yp1580ms70</i>	9	137–173	4, 5, 6, 7, 8	0,602
<i>yp1925ms71</i>	15	157–172	4, 5	0,114
<i>yp3236ms73</i>	18	207–225	4, 5	0,183
<i>yp3245ms74</i>	15	165–225	4, 6, 7, 8	0,375

Таблица 2 / Table 2

Характеристика вновь описанных спейсеров *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы
 Characteristics of newly described spacers of *Y. pestis* from the Caspian sandy plague focus

Локус Locus	Спейсер Spacer	Последовательность Sequence	Длина, п.н. Length, bp	GC-состав, % GC-content, %	Позиция протоспейсера по геному CO92 (AL590842.1) Position of the protospacer across the CO92 genome (AL590842.1)	Ген Gene	Кодируемый продукт Encoded product
<i>YPa</i>	a108	TTGCTGAAGATGTAGTGG CGGCCGGTGTTCAT	31	55	2382262..2382292	YPO2110	Предполагаемый фаговый белок Putative phage protein
	a109	ATGGACAGGCTCCGGAA GGACGAGCAGGTTATT	33	55	2376960..2376992	YPO2103	Предполагаемая фаговая терминаза (псевдоген) Putative phage terminase (pseudogene)
	a110	GCAACCATTCGCTATATG TAGTTCCCGCTGGAT	33	48	2380215..2380246	YPO2108	Гипотетический фаговый белок Hypothetical phage protein
	a111	TGGCTAAAAACATATGAAA CAGAAGTGGCGGTA	32	41	2384756..2384787	YPO2116	Предполагаемый фаговый белок Putative phage protein
	a112	GCAACCATTCGCTATATG TAGTTCCCGCTGGA	32	50	2380199..2380266	YPO2108	Предполагаемый фаговый белок Putative phage protein
<i>YPb</i>	b53	TTGTCGCTCAATGGAAAC ATTAATCACTAAGT	32	34	2380113..2380144	YPO2108	Гипотетический фаговый белок Hypothetical phage protein
	b54	AACGAACCCACGTAGAAT TGCCATCACCGCCGG	33	58	2382982..2383016	YPO2111	Гипотетический фаговый белок Hypothetical phage protein

Таблица 3 / Table 3

CRISPR-профиль штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы
CRISPR profile of *Y. pestis* strains from the Caspian sandy plague focus

Штаммы, годы и регионы выделения Strains, years, and regions of isolation	CRISPR <i>YPa</i>	CRISPR <i>YPb</i>	CRISPR <i>YPc</i>
M1875, 1087, M1336, M1665, M1668, M925, M1648, M1585, M844, M927, M973, M1268, M1635, M586, M691, M773, M781, M822, M824, M850, C706, M635, M1814, M972, M585, M594, 231, 378, 248, 423, KM638, E3379, 177, 686, 469, M693, M871, M593, M690, M819, M821, M595, M588, M849, C701, M587, M1354, M1402, M1343, M1405, KM780, M634, M695, M767, M771, M829, M857, M924, M979, C718, M926, M928, M985, M1531, M845, M895, M898, M903, M820, M1864, M1868, 4285, 226, 664, 258, 480, 278 (1930–2015; Приволжские пески, Ильменно-Придельтовский район, Приморский район, Черные земли, Терско-Кумское междуречье) (1930–2015; Volga Sands, Il'menno-Delta Region, Primorsky Region, Black Lands, Tersko-Kuma Interfluve)	a1-a2-a3	b1-b2-b3-b4 ⁺	c1-c2-c3
52 (1925; Ильменно-Придельтовский район) 52 (1925; Il'menno-Delta Region)	a2-a3	b1-b2-b3-b4 ⁺	c1-c2-c3
228 (1936; Черные земли) 228 (1936; Black Lands)	a1-a2-a3-a108	b1-b2-b3-b4 ⁺	c1-c2-c3
249 (1936; Черные земли) 249 (1936; Black Lands)	a1-a2-a3-a109	b1-b2-b3-b4 ⁺	c1-c2-c3
252 (1933; Терско-Кумское междуречье) 252 (1933; Tersko-Kuma Interfluve)	a1-a2-a3-a109	b1-b2-b3-b4 ⁺ -b53	c1-c2-c3
M1970, M2320, M2328, M2334 (2014; Приморский район) M1970, M2320, M2328, M2334 (2014; Primorsky Region)	a1-a2-a3-a110	b1-b2-b3-b4 ⁺	c1-c2-c3
282 (1935; Черные земли) 282 (1935; Black Lands)	a1-a2-a3-a111	b1-b2-b3-b4 ⁺	c1-c2-c3
M1332, M1334 (1985; Черные земли) M1332, M1334 (1985; Black Lands)	a1-a2-a3-a112	b1-b2-b3-b4 ⁺	c1-c2-c3
M1671 (1996; Черные земли) M1671 (1996; Black Lands)	a1-a2-a3-a4-a5-a6-a37	b1-b2-b3-b4 ⁺	c1-c2-c3
M1664 (1997; Черные земли) M1664 (1997; Black Lands)	a1-a2-a3-a4-a6-a7-a37-a75	b1-b2-b3-b4 ⁺	c1-c2-c3
M1669 (1996; Черные земли) M1669 (1996; Black Lands)	a1-a2-a3-a4-a5-a6-a7-a8	b1-b2-b3-b4 ⁺	c1-c2-c3
M2344 (2014; Приморский район) M2344 (2014; Primorsky Region)	a1-a2-a3-a4-a5-a6-a7-a8	b1-b2-b3-b4 ⁺ -b47	c1-c2-c3
M1611 (1995; Черные земли) M1611 (1995; Black Lands)	a1-a2-a3-a4-a5-a6-a7-a8	b1-b2-b3-b4 ⁺ -b48	c1-c2-c3
M1229, M1534, M1544, M1545, M1867 (1993–2009; Черные земли, Терско-Кумское междуречье) M1229, M1534, M1544, M1545, M1867 (1993–2009; Black Lands, Tersko-Kuma Interfluve)	a1-a2-a3-a4-a5-a6-a7-a8	b1-b2-b3-b4 ⁺ -b54	c1-c2-c3

b53, b54 в локусах *YPa* и *YPb*. В то же время штаммы 1993–2014 гг., полученные от носителей и переносчиков в Приморском районе, Черных землях и Терско-Кумском междуречье, имеют существенные отличия в локусе *YPa* и *YPb*. Так, локус *YPa* восьми штаммов (M1229, M1534, M1544, M1545, M1611, M1669, M1867, M2344), полученных в 1993–2014 гг. от носителей и переносчиков, представлен спейсерами *YPa* a1-a2-a3-a4-a5-a6-a7-a8. Для штаммов M1664 (1997, *M. musculus*) и M1671 (1996, *M. meridianus*) характерны спейсеры *YPa* a1-a2-a3-a4-a6-a7-a37-a75 и a1-a2-a3-a4-a5-a6-a37 соответственно. Штаммы M1611 (1995, *S. pygmaeus*) и M2344 (2014, *M. meridianus*) представлены спейсерами *YPb* b1-b2-b3-b4⁺-b48 и b1-b2-b3-b4⁺-b47 соответственно.

В целом метод CRISPR-типирования показал низкую разрешающую способность при дифференцировании штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы, однако может служить дополнительным инструментом при проведении филогенетического анализа в совокупности с такими методами, как SNP- и MLVA-типирование.

По результатам проведенного MLVA25- и CRISPR-типирования штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы построена дендрограмма (рисунок). Результаты филогенетического анализа показывают, что в исследуемой выборке выделяются три кластера (А, В, С), в состав которых входят 40, 49 и 10 штаммов соответственно. Установлена взаимосвязь изменения копийности VNTR-повторов

в локусах в зависимости от времени и места выделения штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы.

Кластер *A* включает в себя два больших подкластера (*A1* и *A2*). Подкластер *A1* образован 30 штаммами, полученными от носителей и переносчиков во второй половине XX – начале XXI в. на территории Ильменно-Придельтового и Приморского районов, Черных земель, Терско-Кумского междуречья. В свою очередь подкластер *A2* представлен преимущественно штаммами, выделенными до межэпизоотического периода в первой половине XX в. на территории Черных земель и Именно-Придельтового района, среди которых два штамма – 177 и 228 – были получены от больных с легочной и бубонной формой чумы в 1933 и 1936 гг. соответственно. Кластер *A* образовали штаммы с генотипами CS1 – CS27. Большинство генотипов (CS1, CS5, CS8, CS10) представлены штаммами, которые были выделены в пределах нескольких граничащих между собой секторов в течение 5–11 лет.

Кластер *B* разделен на два подкластера (*B1* и *B2*). Подкластер *B1* представлен преимущественно штаммами второй половины XX – начала XXI в., выделенными от носителей и переносчиков на территории всех пяти ЛЭР Прикаспийского песчаного очага чумы. Исключение составил штамм 252, полученный от домового мыши *M. musculus* в 1936 г. Подкластер *B2* образован штаммами, выделенными до межэпизоотического периода в первой половине XX в. на территории Черных земель. Среди них присутствует штамм 226, который был получен в 1936 г. от человека с септической формой чумы. Кластер *B* представлен штаммами с генотипами CS28 – CS52. От штаммов, входящих в состав кластеров *A* и *C*, их отличает наличие семи копий VNTR в локусе *yp1018ms44* вместо шести. В кластере *B*, так же как и в кластере *A*, большинство генотипов (CS28, CS29, CS31, CS35, CS38, CS40) образованы штаммами, полученными в течение 3–7 лет в пределах нескольких граничащих между собой секторов. Однако проявляются и исключения из этой закономерности: штаммы генотипа CS34 получены в течение 5 лет на удаленных друг от друга секторах в Черных землях; генотип CS36 представлен штаммами, выделенными в течение 4 лет на удаленных друг от друга секторах в Приволжских песках, Приморском и Ильменно-Придельтовом районах; а в генотип CS45 вошли штаммы, также полученные на удаленных друг от друга секторах в Приморском районе и Черных землях в течение 29 лет.

Кластер *C* образован 10 штаммами с генотипом CS53 – CS60. Эти штаммы были получены от носителей и переносчиков с 1993 по 2015 г. преимущественно на территории Черных земель. От штаммов, входящих в состав кластеров *A* и *B*, их отличает наличие уникального количества копий VNTR в таких локусах, как *yp1814ms20*, *yp4425ms38*, *yp0718ms41*, *yp1118ms69*, *yp3236ms73*, *yp3245ms74*. Также для

штаммов этого кластера характерны удлинённые массивы спейсеров CRISPR в локусе *YPa*.

При оценке полученных результатов филогенетического анализа нами установлена взаимосвязь изменения копийности VNTR-повторов в локусах в зависимости от времени и места выделения штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы. Так, для штаммов, циркулировавших на территории очага с 1925 по 1954 г. до наступления длительного межэпизоотического периода, характерно большее разнообразие копийности фрагментов VNTR в локусах *yp1335ms46* и *yp4280ms62* по сравнению со штаммами, полученными в 1979–2015 гг. после межэпизоотического периода. В геноме штамма *Y. pestis* CO92 (NCBI GenBank ID AL590842.1) локус *yp1335ms46* расположен в межгенной области, а локус *yp4280ms62* находится в пределах нуклеотидной последовательности гена *ftsY*, кодирующего белок клеточного деления.

Также штаммы первой половины XX в. и второй половины XX – начала XXI в. имеют различия копийности фрагментов VNTR в локусе *yp1935ms05*. Штаммы, полученные до межэпизоотического периода, имеют 8 копий VNTR в локусе *yp1935ms05*, в то время как локус *yp1935ms05* штаммов второй половины XX – начала XXI в. представлен 7 и 9 копиями VNTR. В геноме штамма *Y. pestis* CO92 локус *yp1935ms05* расположен в межгенной области.

Также, несмотря на то, что большинство исследуемых штаммов по локусу *yp0559ms15* имеют одинаковый размер ампликона (237 п.н.), при изучении их нуклеотидной последовательности нами установлено, что 11 штаммов (M1875, 1087, M1334, M2320, M1970, M1864, M1868, 4285, M1332, M2328, M2334) имеют единичную замену C → A (559860 – координата по геному CO92 NCBI GenBank ID AL590842.1). Они были получены в 1985–2014 гг. от носителей и переносчиков на территории Приморского района и Черных земель. При сравнении полученной последовательности с последовательностями базы данных GenBank NCBI установлено, что данная замена уникальна и характерна только для этих штаммов. В геноме штамма *Y. pestis* CO92 локус *yp0559ms15* расположен в межгенной области. Эти же 11 штаммов имеют 7 копий VNTR в локусе *yp3245ms74* (вместо 4, 6 и 8 копий VNTR, в отличие от остальных изученных штаммов из Прикаспийского песчаного очага чумы). В геноме штамма *Y. pestis* CO92 локус *yp3245ms74* расположен в пределах нуклеотидной последовательности гена *YPO2903*, кодирующего предполагаемый РНК-связывающий белок.

Десять штаммов (M1664, M1671, M1669, M1611, M2344, M1229, M1534, M1544, M1545, M1867), полученных от носителей и переносчиков преимущественно на территории Черных земель в 1993–2014 гг., имеют уникальное количество копий VNTR в локусах *yp1814ms20*, *yp4425ms38*, *yp0718ms41*, *yp1118ms69*, *yp3236ms73*, *yp3245ms74*, отличающееся от остальных изученных штаммов в данной работе.

В геноме штамма *Y. pestis* CO92 локусы *yp1814ms20*, *yp4425ms38*, *yp0718ms41*, *yp1118ms69* расположены в межгенной области; локус *yp3236ms73* находится в пределах нуклеотидной последовательности гена *hsc*, кодирующего белок-шаперон Hsc-A; локус *yp3245ms74* расположен в пределах нуклеотидной последовательности гена *YPO2903*, кодирующего предполагаемый РНК-связывающий белок. Мы полагаем, что полученные MLVA-профили были характерными для данных участков Прикаспийского песчаного очага чумы в период с 1993 по 2014 г. При анализе связи штаммов, представленных одним генотипом, с объектами, из которых они были выделены, не обнаружено зависимости от видов млекопитающих и эктопаразитов.

Итак, проведено MLVA25- и CRISPR-типирование 98 штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы, выделенных в 1925–2015 гг., в результате которого исследуемые штаммы разделились на 60 генотипов (CS1 – CS60). Большинство штаммов (78 %) из Прикаспийского песчаного очага чумы, независимо от места, времени выделения и принадлежности к филогенетическим подветвям 2.MED1 средневекового биовара, имеют идентичный CRISPR-профиль, представленный спейсерами *YPa* a1-a2-a3, *YPb* b1-b2-b3-b4', *YPC* c1-c2-c3. Полученный массив спейсеров характерен для штаммов *Y. pestis* средневекового биовара. Однако часть штаммов имеют делецию спейсера в локусе *YPa* или же удлиненные массивы спейсеров в локусах *YPa* и *YPb*. Также выявлены вставки спейсеров, специфичные как для группы, так и для единичных штаммов из Прикаспийского песчаного очага чумы. Установлена взаимосвязь изменения копийности локусов VNTR в зависимости от места и времени выделения штаммов. Полученные нуклеотидные последовательности дополнили созданную ранее базу данных. Результаты MLVA25- и CRISPR-типирования могут быть использованы для проведения детализации молекулярно-генетической паспортизации территории Прикаспийского песчаного очага чумы, а также для проведения ретроспективного анализа направлений и закономерностей пространственно-временной циркуляции популяций *Y. pestis* в очагах чумы Прикаспия в XX – начале XXI в.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств. Калининград: РА Полиграфичъ; 2022. 348 с.
2. 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.

3. Adair D.M., Worsham P.L., Hill K.K., Klevytska A.M., Jackson P.J., Friedlander A.M., Keim P. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(4):1516–9. DOI: 10.1128/JCM.38.4.1516-1519.2000.
4. Vogler A.J., Keim P., Wagner D.M. A review of methods for subtyping *Yersinia pestis*: From phenotypes to whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 37:21–36. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.10.024.
5. Al-Attar S., Westra E.R., van der Oost J., Brouns S.J. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol. Chem.* 2011; 392(4):277–89. DOI: 10.1515/BC.2011.042.
6. Barrangou R., Horvath P. CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012; 3:143–62. DOI: 10.1146/annurev-food-022811-101134.
7. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005; 151(Pt. 3):653–63. DOI: 10.1099/mic.0.27437-0.
8. Cui Y., Li Y., Gorgé O., Platonov M.E., Yan Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Balakhonov S.V., Wang X., Song Y., Anisimov A.P., Vergnaud G., Yang R. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *PLoS One*. 2008; 3(7):e2652. DOI: 10.1371/journal.pone.0002652.
9. Riehm J.M., Projahn M., Vogler A.J., Rajerison M., Andersen G., Hall C.M., Zimmermann T., Soanandrasana R., Andrianavoa R., 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.
10. He J., Jin J., Xin Y., Yang X., Li S., Zhang Q., Bai J., Li G., Dai R., Li W. CRISPR genotyping of *Yersinia pestis* in the plague natural foci of Qinghai-Tibet Plateau. *Chin. J. Endemiol.* 2022; 41(9):703–8. DOI: 10.3760/cma.j.cn231583-20220304-00063.
11. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P.L., Wong J., Keim P. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9):3179–85. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3179-3185.2001.
12. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramisse V., Sylvestre P., Benson G., Ramisse F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 2001; 1:2. DOI: 10.1186/1471-2180-1-2.
13. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(2):573–80. DOI: 10.1093/nar/27.2.573.
14. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11):2465–6. DOI: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.
15. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980; 32(3):314–31.
16. Derbise A., Chenal-Francisque V., Pouillot F., Fayolle C., Prévost M.C., Médigue C., Hinnebusch B.J., Carniel E. A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus. *Mol. Microbiol.* 2007; 63(4):1145–57. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05570.x.
17. Li Y., Dai E., Cui Y., Li M., Zhang Y., Wu M., Zhou D., Guo Z., Dai X., Cui B., Qi Z., Wang Z., Wang H., Dong X., Song Z., Zhai J., Song Y., Yang R. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China. *PLoS One*. 2008; 3(5):e2166. DOI: 10.1371/journal.pone.0002166.
18. Barrangou R., Horvath P. The CRISPR system protects microbes against phages, plasmids. Palindromic DNA repeat sequences immunize microorganisms against phages and plasmids, while also directing their evolution. *Microbe*. 2009; 4(5):224–30. DOI: 10.1128/MICROBE.4.224.1.

References

1. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Atlas of Natural Plague Foci of Russia and Foreign Countries]. Kaliningrad: RA Poligrafich; 2022. 348 p.
2. 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.
3. Adair D.M., Worsham P.L., Hill K.K., Klevytska A.M., Jackson P.J., Friedlander A.M., Keim P. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(4):1516–9. DOI: 10.1128/JCM.38.4.1516-1519.2000.

4. Vogler A.J., Keim P., Wagner D.M. A review of methods for subtyping *Yersinia pestis*: From phenotypes to whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 37:21–36. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.10.024.
5. Al-Attar S., Westra E.R., van der Oost J., Brouns S.J. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol. Chem.* 2011; 392(4):277–89. DOI: 10.1515/BC.2011.042.
6. Barrangou R., Horvath P. CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012; 3:143–62. DOI: 10.1146/annurev-fo.od-022811-101134.
7. Pourcel C., Salviñol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005; 151(Pt. 3):653–63. DOI: 10.1099/mic.0.27437-0.
8. Cui Y., Li Y., Gorgé O., Platonov M.E., Yan Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Balakhonov S.V., Wang X., Song Y., Anisimov A.P., Vergnaud G., Yang R. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *PLoS One*. 2008; 3(7):e2652. DOI: 10.1371/journal.pone.0002652.
9. Riehm J.M., Projahn M., Vogler A.J., Rajerison M., Andersen G., Hall C.M., Zimmermann T., Soanandrasana R., Andrianavaoimanana 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.
10. He J., Jin J., Xin Y., Yang X., Li S., Zhang Q., Bai J., Li G., Dai R., Li W. CRISPR genotyping of *Yersinia pestis* in the plague natural foci of Qinghai-Tibet Plateau. *Chin. J. Endemiol.* 2022; 41(9):703–8. DOI: 10.3760/cma.j.cn231583-20220304-00063.
11. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P.L., Wong J., Keim P. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9):3179–85. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3179-3185.2001.
12. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramière V., Sylvestre P., Benson G., Ramière F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 2001; 1:2. DOI: 10.1186/1471-2180-1-2.
13. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(2):573–80. DOI: 10.1093/nar/27.2.573.
14. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11):2465–6. DOI: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.
15. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980; 32(3):314–31.
16. Derbise A., Chenal-Francisque V., Pouillot F., Fayolle C., Prévost M.C., Médigue C., Hinnebusch B.J., Carniel E. A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus. *Mol. Microbiol.* 2007; 63(4):1145–57. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05570.x.
17. Li Y., Dai E., Cui Y., Li M., Zhang Y., Wu M., Zhou D., Guo Z., Dai X., Cui B., Qi Z., Wang Z., Wang H., Dong X., Song Z., Zhai J., Song Y., Yang R. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China. *PLoS One*. 2008; 3(5):e2166. DOI: 10.1371/journal.pone.0002166.
18. Barrangou R., Horvath P. The CRISPR system protects microbes against phages, plasmids. Palindromic DNA repeat sequences immunize microorganisms against phages and plasmids, while also directing their evolution. *Microbe*. 2009; 4(5):224–30. DOI: 10.1128/MICROBE.4.224.1.

Authors:

Goryunova P.A., Eroshenko G.A., Balykova A.N., Kovrizhnikov A.V., Shevchenko K.S., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Chervyakova N.S., Kutyrev 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., Балькова А.Н., Коврижников А.В., Шевченко К.С., Куклева Л.М., Нарышкина 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: 10.21055/0370-1069-2023-4-77-83

УДК 616.921.5(470)

Т.Н. Ильичева, А.А. Моисеева, К.И. Иванова, М.Ш. Азаев, В.Ю. Марченко

Серомониторинг маркеров вирусов гриппа с пандемическим потенциалом в Российской Федерации в 2021–2023 гг.*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Российская Федерация*

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора с 2005 г. проводится надзор за высокопатогенным гриппом. **Цель** работы – мониторинг маркеров вирусов гриппа с пандемическим потенциалом в сыворотках крови людей, имевших контакт с больной и/или погибшей птицей, а также жителей регионов, где наиболее вероятно появление новых вариантов вируса гриппа А. **Материалы и методы.** Сыворотки исследованы в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Положительные в РТГА сыворотки тестированы в реакции нейтрализации. **Результаты и обсуждение.** В 2021 г. было собрано 2076 образцов сыворотки крови в 19 регионах Российской Федерации. Только 7 образцов имели значимые титры в РТГА с вирусами А/Н5N8. В 2022 г. собрано 1620 образцов сыворотки крови в 23 регионах, 25 из них были положительными к вирусам гриппа А/Н5N8 и А/Н5N1. В январе – августе 2023 г. собрано 3335 образцов сыворотки в 31 регионе РФ, 28 из них были положительными к вирусам гриппа А/Н5N8 и А/Н5N1. Также проводится серомониторинг в отношении низкопатогенного вируса субтипа А/Н9N2. Количество серопозитивных образцов в 2021 г. было ниже 1 % (13 из 2076 образцов), в 2022 г. – 5,0 % (81 из 1620 образцов), в 2023 г. позитивных образцов – менее 1 % (31 из 3335 образцов). Полученные данные косвенно свидетельствуют, что в настоящее время среди населения Российской Федерации нет стабильной циркуляции вирусов зоонозного гриппа субтипов А/Н5N8 и А/Н5N1. Вирус гриппа субтипа А/Н9N2 широко распространен в многих странах мира и активно участвует в эволюции высокопатогенных субтипов вируса гриппа А/Н5Nx. В РФ наблюдается постепенное увеличение серопозитивности к вирусу А/Н9N2.

Ключевые слова: надзор за вирусами гриппа, сыворотки крови людей, антитела к вирусам зоонозного гриппа.

Корреспондирующий автор: Ильичева Татьяна Николаевна, e-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Ильичева Т.Н., Моисеева А.А., Иванова К.И., Азаев М.Ш., Марченко В.Ю. Серомониторинг маркеров вирусов гриппа с пандемическим потенциалом в Российской Федерации в 2021–2023 гг. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023; 4:77–83. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-77-83

Поступила 16.08.2023. Отправлена на доработку 20.09.2023. Принята к публ. 05.10.2023.

T.N. Ilyicheva, A.A. Moiseeva, K.I. Ivanova, M.Sh. Azaev, V.Yu. Marchenko

Serological Monitoring of Pandemic Influenza Virus Markers in the Russian Federation in 2021–2023*State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Russian Federation*

Abstract. State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector” has been monitoring highly pathogenic influenza since 2005. **The aim** of this work was to track the markers of highly pathogenic influenza in the blood sera of people who had a contact with infected and/or deceased birds, as well as of residents from regions where emergence of new variants of influenza A virus is most likely to occur. **Materials and methods.** Sera were studied using hemagglutination inhibition test (HI test). HI-positive sera were subjected to virus neutralization reaction. **Results and discussion.** In 2021, 2076 blood serum samples from 19 regions of Russia were collected. Only 7 samples demonstrated significant titers in HI test with A/H5N8 viruses. In 2022, 1620 blood serum samples from 23 regions were obtained; 25 of them were positive for influenza A/H5N8 and A/H5N1 viruses. In 2023 (January–August), 3335 serum samples from 31 regions of the Russian Federation were collected. 28 samples were positive for influenza A/H5N8 and A/H5N1 viruses. Furthermore, we monitored blood sera for low-pathogenic A/H9N2 virus. The number of positive samples in 2021 was lower than 1 % (13 out of 2076); in 2022, it reached 5 % (81 out of 1620); in 2023, the share was lower than 1 % (31 out of 3335). The data obtained suggest indirectly that currently there is no stable circulation of zoonotic influenza A/H5N8 and A/H5N1 viruses in Russia. Influenza viruses A/H9N2 have widely spread in many countries of the world and actively participate in evolution of highly pathogenic influenza A/H5Nx viruses. The Russian Federation demonstrates a gradual increase in the number of blood serum samples with antibodies to A/H9N2 virus.

Key words: surveillance of influenza viruses, human blood sera, antibodies to zoonotic influenza viruses.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Tatiana N. Ilyicheva, e-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru.

Citation: Ilyicheva T.N., Moiseeva A.A., Ivanova K.I., Azaev M.Sh., Marchenko V.Yu. Serological Monitoring of Pandemic Influenza Virus Markers in the Russian Federation in 2021–2023. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2023; 4:77–83. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-77-83

Received 16.08.2023. Revised 20.09.2023. Accepted 05.10.2023.

Ilyicheva T.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2354-7688>
Azaev M.Sh., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2587-4559>

Marchenko V.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1339-6732>

Естественным резервуаром вирусов гриппа А являются птицы водного и околородного ареалов, у которых болезнь протекает преимущественно в субклинической форме. В результате генетических изменений вирусы гриппа могут преодолевать видовой барьер и приобретать способность циркулировать среди новых хозяев. Иногда вирусы гриппа А становились эндемичными для других видов животных или человека.

Летом 2005 г. высокопатогенный вирус гриппа А(Н5N1) впервые выделен и охарактеризован в России. Тем не менее в 2005–2016 гг. ни в одном образце от людей вирус А(Н5Nх) не был обнаружен, и только единичные образцы сыворотки крови имели значимые титры в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и микронеutralизации с вирусами А(Н5N1), А(Н5N8), А(Н5N6) или А(Н9N2). За все время наблюдений ни одной сыворотки с антителами к высокопатогенному вирусу А(Н7N9) не обнаружено [1].

В 2016–2017 гг. зафиксирована масштабная эпизоотия среди диких и сельскохозяйственных птиц в европейской части России, вызванная высокопатогенным вирусом гриппа А(Н5N8). Наиболее крупные вспышки среди домашней птицы регистрировались на птицефабриках и частных подворьях республик Калмыкия, Татарстан, а также в Московской, Тульской, Нижегородской, Астраханской и Воронежской областях. В каждом регионе был проведен сбор образцов сывороток крови от людей, контактировавших с больной и павшей птицей (фермеры, сотрудники птицефабрик), для оценки уровня антител к высокопатогенному вирусу гриппа. Протестировано 760 образцов парных сывороток крови в РТГА с высокопатогенными штаммами вируса гриппа A/rook/Chany/32/2015 (Н5N1) и A/chicken/Sergiev Posad/38/2017 (Н5N8). Положительными в РТГА к штаммам А(Н5N1) и (Н5N8) были 28 и 61 образец соответственно. Сыворотки, положительные в РТГА, анализировали в реакции нейтрализации. Только 40 % образцов, положительных в РТГА, были положительными в реакции нейтрализации [2].

В декабре 2020 г. произошла вспышка высокопатогенного гриппа птиц А/Н5N8 на территории Владимирской птицефабрики в Астраханской области. Контактывали с мертвой птицей или находились на территории птицефабрики с начала вспышки 56 сельскохозяйственных рабочих. Собрано 56 образцов сыворотки и 37 мазков из носоглотки. Образцы сыворотки повторно брали через 14 и 44 дня после первого сбора. По данным районной больницы, у всех контактных в течение 21 дня наблюдения не было симптомов заболевания. Образцы сыворотки птицеводов тестировали в реакции нейтрализации в клетках MDCK, в реакции торможения гемагглютинации с эритроцитами лошади и биослойной интерферометрии (BLI). Наличие специфических антител IgG против вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (Н5N8), выделенного от сотрудника птицефабрики, под-

тверждено методом биослойной интерферометрии для 5 образцов сыворотки, полученных на 14-й день, и для всех образцов, полученных на 44-й день [3].

В зимний сезон 2016/17 г. высокопатогенный вирус гриппа птиц А(Н5Nх) клады 2.3.4.4 вызвал одну из крупнейших эпизоотий в Европе (2781 вспышка). Еще большее количество вспышек среди домашней птицы (3777) и случаев массовой гибели диких птиц произошли в 2020–2021 гг. Во время этой волны появлялись множественные реассортанты с участием высокопатогенных вирусов А(Н5Nх), они быстро диверсифицировались, что привело к совместной циркуляции 19 различных генотипов, принадлежащих к 5 различным подтипам (Н5N1, Н5N3, Н5N4, Н5N5 и Н5N8). Глобальное распространение и рекомбинация с различными местными низкопатогенными вирусами увеличивает множественность вирусов клады 2.3.4.4 и происходит намного быстрее и с более высокой скоростью, чем наблюдалось в прошлом для других ветвей вирусов Н5, Н7 или Н9.

В связи с этим целью работы являлся поиск маркеров вирусов гриппа с пандемическим потенциалом в сыворотках крови людей, имевших контакт с больной и/или погибшей птицей, и жителей регионов, расположенных на путях миграции дикой водоплавающей птицы.

Материалы и методы

Образцы сывороток крови людей собраны сотрудниками центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации. Данные о регионе и периоде сбора образцов представлены в табл. 1.

Сыворотки исследовали в реакции торможения гемагглютинации и реакции нейтрализации по общепринятым методикам [4]. В РТГА использовали антигенами, представляющими собой вирусодержащую культуральную жидкость, инактивированную β-пропиолактоном. Для приготовления антигенов использовали высокопатогенные штаммы A/chicken/Astrakhan/32105/2020 (Н5N8) и A/Астрахань/3212/2020 (Н5N8), выделенные от кур и человека соответственно во время вспышки зоонозного гриппа на птицефабрике в Астраханской области в 2020 г., высокопатогенный штамм A/chicken/Khabarovsk/24-12V/2022 (Н5N1), высокопатогенный штамм A/chicken/Nghe An/27VTC/2018 (Н5N6) и низкопатогенные штаммы A/chicken/NghiLoc/222VTC/2019 (Н9N2) и A/chicken/Primorsky Krai/03/2018 (Н9N2), выделенные из образцов, собранных во Вьетнаме и России соответственно. Все штаммы выделены в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Антигенная характеристика штаммов А/Н5 приведена в табл. 2.

Результаты и обсуждение

В 2021 г. нами было собрано 2076 образцов сыворотки крови в 19 регионах РФ от людей, кон-

Таблица 1 / Table 1

Данные о тестированных образцах сыворотки крови

Data on blood sera samples tested

Регион сбора Region of collection	Количество собранных образцов в году Number of samples collected per year			Регион сбора Region of collection	Количество собранных образцов в году Number of samples collected per year		
	2021	2022	2023		2021	2022	2023
Волгоградская область Volgograd Region	50		50	Рязанская область Ryazan Region		14	
Магаданская область Magadan Region	200	23	138	Орловская область Orel Region		6	
Костромская область Kostroma Region	50			Калужская область Kaluga Region		12	4
Сахалинская область Sakhalin Region	150		775	Белгородская область Belgorod Region		30	
Новосибирская область Novosibirsk Region	265			Челябинская область Chelyabinsk Region		17	
Республика Татарстан Republic of Tatarstan	100	8	100	Ямало-Ненецкий автономный округ Yamalo-Nenets Autonomous District		185	
Республика Крым Republic of Crimea	50	52	50	Ростовская область Rostov Region		10	
Астраханская область Astrakhan Region	87	49	112	Республика Ингушетия Republic of Ingushetia		25	50
Ханты-Мансийский автономный округ Khanty-Mansi Autonomous District	24		40	Пермский край Perm Territory			380
Республика Башкортостан Republic of Bashkortostan	200			Республика Калмыкия Republic of Kalmykia			125
Краснодарский край Krasnodar Territory	200			Приморский край Primorsk Territory			205
Пензенская область Penza Region	58			Амурская область Amur Region			50
Ставропольский край Stavropol Territory	50	74	200	Чеченская Республика Chechen Republic			50
Самарская область Samara Region	331	48		Республика Марий Эл Mari El Republic			80
Республика Дагестан Republic of Dagestan	6			Московская область Moscow Region			48
Оренбургская область Orenburg Region	100	220		Калининградская область Kaliningrad Region			10
Хабаровский край Khabarovsk Territory	100	72	250	Нижегородская область Nizhny Novgorod Region			29
Тюменская область Tyumen Region	10	260	134	Ярославская область Yaroslavl Region			154
Курская область Kursk Region		114		Смоленская область Smolensk Region			9
Саратовская область Saratov Region		65	77	Республика Коми Komi Republic			6
Курганская область Kurgan Region		5		Владимирская область Vladimir Region			18
Удмуртская Республика Udmurt Republic		5	60	Воронежская область Voronezh Region			2
Кировская область Kirov Region		274		Вологодская область Vologda Region			79
Республика Адыгея Republic of Adygea		52	50	Всего образцов Total number of samples	2076	1620	3335

Таблица 2 / Table 2

Антигенная характеристика штаммов вируса гриппа подтипа А/Н5 по данным РТГА

Antigenic characteristics of A/H5 subtype influenza virus strains according to HI test

Вирусы Viruses		Референс-сыворотки хорьков Reference sera of ferrets				
		A/gyrfalcon/ Washington/ 41088-6/2014	A/Astrakhan/ 3212/2020	A/chicken/ Nghe An/ 27VTC/2018	A/dalmatian pelican/ Astrakhan/ 213-2V/2022	A/chicken/ Khabarovsk/ 24-1V/2022
Референс-антигены Reference antigens	Субтип Subtype	Субклада Subclade				
		2.3.4.4c	2.3.4.4b	2.3.4.4f	2.3.4.4b	2.3.4.4b
A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014	H5N8	320	640	640	640	320
A/Astrakhan/3212/2020	H5N8	80	160	80	80	160
A/chicken/Astrakhan/32105/2020	H5N8	80	160	80	80	160
A/chicken/Nghe An/27VTC/2018	H5N6	320	640	640	640	320
A/dalmatian pelican/Astrakhan/213-2V/2022	H5N1	160	320	320	320	320
A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022	H5N1	20	80	80	80	320

тактировавших с домашней или сельскохозяйственной птицей. Только единичные образцы сыворотки крови имели значимые титры в РТГА с вирусами А/Н5N8 (7 образцов, менее 1 %). В 2022 г. собрано 1620 образцов сыворотки крови в 23 регионах РФ от людей, контактировавших с домашней птицей. Положительными к вирусам гриппа А/Н5N8 и А/Н5N1 были 25 образцов (1,5 %). В январе – августе 2023 г. собрано 3335 образцов сыворотки в 31 регионе РФ, менее 1 % (28 шт.) были положительными к вирусам гриппа А/Н5N8 и А/Н5N1. Результаты представлены в табл. 3.

Положительные в РТГА образцы тестировали в реакции нейтрализации, все образцы были отрицательными (титр ниже 1:20).

Одна из проблем с тестированием сывороток на наличие антител к вирусам А/Н5Nx заключается в том, что часто антисыворотки против одного штамма не взаимодействуют в РТГА с другими штаммами того же субтипа, а иногда и той же субклады. Поэтому при тестировании сывороток приходится использовать несколько штаммов. При анализе вспышек птичьего гриппа мы используем в РТГА и вируснейтрализации штамм вируса, выделенный от птиц на этой территории и штамм(ы), наиболее ча-

сто выделяемые на территории России в последнее время, или антигенно сходные штаммы, выделенные в других регионах.

Кроме маркеров высокопатогенных вирусов субтипов А/Н5Nx, мы проводим серомониторинг в отношении низкопатогенного вируса субтипа А/Н9N2. В 2021 г. количество серопозитивных образцов было ниже 1 % (13 из 2076 сывороток крови), в 2022 г. серопозитивных к А/Н9 – уже 5,0 % (81 из 1620 сывороток крови). Возможно, это связано с меньшим количеством собранных образцов, так как в 2023 г. позитивных образцов опять было менее 1 % (31 из 3335 образцов) (см. табл. 1).

Все сыворотки, положительные в РТГА, исследовали в реакции нейтрализации. Все образцы, положительные в РТГА с вирусом А/Н9N2, в реакции нейтрализации были также положительными (титры выше 1:40).

Чтобы вызвать пандемию, вирус гриппа должен преодолеть два основных барьера: во-первых, он должен быть антигенно новым для человека, во-вторых, вирус должен передаваться напрямую от человека к человеку с высокой эффективностью.

Одновременное заражение человека вирусом сезонного гриппа А (оптимально адаптированно-

Таблица 3 / Table 3

Количество позитивных образцов сыворотки крови к вирусам А/Н5 и А/Н9 по данным РТГА в 2021–2023 гг.

The number of positive for A/H5 and A/H9 viruses blood sera samples according to HI test in 2021–2023

Период сбора образцов Years of sample collecting	Всего собранных образцов Total number of samples collected	Процент (количество) серопозитивных к А/Н5 образцов Percent (number) of A/H5 seropositive specimens	Процент (количество) серопозитивных к А/Н9N2 образцов Percent (number) of A/H9N2 seropositive specimens
2021	2076	<1 % (7)	<1 % (13)
2022	1620	1,5 % (25)	5 % (81)
2023 (январь – август) (January-August)	3335	<1 % (11)	0,9 % (31)

го к человеку) и вирусом гриппа птиц (или других животных) может привести к реассортации (пересортировке геномов). В этом случае увеличивается вероятность появления нового варианта вируса, антигенно отличающегося от человеческих штаммов (гены гемагглютинина и/или нейраминидазы от вируса гриппа животных) и способного размножаться в человеческих клетках (остальные РНК-сегменты от вируса гриппа человека). Но чтобы появился вирус, эффективно заражающий и передающийся от человека к человеку, необходима дальнейшая адаптация [5].

На всех этапах жизненного цикла вирус использует ферменты, другие молекулы или структуры клетки-хозяина, поэтому вирусу гриппа человека недостаточно «поменять» наружные гликопротеины на гликопротеины вирусов животных, чтобы появился пандемический вариант. Еще сложнее выглядит процесс постепенной адаптации вируса гриппа птиц к человеку.

Так, в прошлых пандемиях гриппа требовалось как минимум две адаптивные замены в рецептор-связывающем сайте, чтобы сместить предпочтение от $\alpha 2,3$ SA (рецептор для вируса гриппа птиц) к $\alpha 2,6$ SA (рецептор для вируса гриппа человека) [6]. Вирусный гемагглютинин синтезируется как неактивный предшественник, чтобы избежать преждевременной активации. Протеолитическое расщепление предшественника гемагглютинина (HA0) протеазами на субъединицы HA1 и HA2 делает возможным высвобождение вирусных молекул из эндосомы. Поскольку ферменты для разрезания HA0 не закодированы в геноме вируса, вирус использует протеазы клетки-хозяина. Доступность соответствующих протеаз хозяина имеет решающее значение для эффективной репликации вируса. Слияние вирусной и клеточной мембран происходит при кислом pH среды, после необратимого конформационного изменения HA [7]. Все вирусы гриппа А имеют pH активации HA от 5,0 до 6,0, при этом для птичьих вирусов (подтипы H5N1, H7N7, H7N9, H9N2) средний pH активации HA равен 5,7, а для вирусов человека (подтипы H1N1, H3N2) – 5,4.

Для проникновения рибонуклеопротеина в ядро вирус использует клеточный импортин α , в транскрипции и репликации используется белок ANP32A из семейства кислых ядерных фосфопротеинов, в трансляции мРНК сплайсированных вирусных генов участвует регулятор сплайсинга хозяина huTRA2A, при транскрипции генома вирус использует РНК-полимеразу II хозяина (Pol II), а рибосомы, комплекс Гольджи, цитоплазматический ретикулум задействованы в синтезе вирусных белков и транспорте их к местам сборки вирусных частиц. Кроме того, температура тела человека 37 °С, а водоплавающих птиц, например, 41–43 °С (утка) и 40–42 °С (гусь).

Даже краткое перечисление основных препятствий для репликации вируса гриппа животных в ор-

ганизме человека показывает, почему вирусы гриппа птиц не часто проникают в человеческую популяцию и вызывают значительные вспышки заболевания и даже пандемии. Тем не менее с определенной периодичностью пандемии гриппа случаются. Полагают, что в появлении пандемических вирусов задействованы два основных механизма: реассортация геномов вирусов гриппа человека и животных и/или постепенная адаптация к новому хозяину.

При любом механизме появления пандемических вариантов вируса есть предпандемический период, который необходим вирусу для оптимальной адаптации к человеку. Отследить этот процесс сложно, так как новые, промежуточные, варианты вируса могут не вызывать тяжелого заболевания человека и долго оставаться незамеченными. В таком случае понять, идет ли процесс адаптации, можно косвенно, по результатам анализа сывороток крови населения тех регионов, где наиболее вероятно появление вирусных вариантов с пандемическим потенциалом.

Ситуация в мире с заболеванием людей птичьим гриппом остается напряженной. Так, с января 2003 по сентябрь 2023 г. зарегистрировано в общей сложности 876 случаев заражения людей вирусом птичьего гриппа А(H5N1). Из них 458 – со смертельным исходом, в результате чего уровень летальности составил 53 %. С 2014 г. во Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) зарегистрировано в общей сложности 87 лабораторно подтвержденных случаев заражения людей вирусом гриппа А(H5N6), включая 33 случая летального исхода (уровень летальности – 38 %). Последний случай инфицирования человека вирусом А/Н5 зарегистрирован во Вьетнаме 22 октября 2022 г., подтип NA определить не удалось. С марта 2013 г. во всем мире зарегистрировано в общей сложности 1568 случаев заболевания людей птичьим гриппом А(H7N9), уровень летальности – более 40 %. Последний случай зарегистрирован 5 апреля 2019 г. С декабря 2015 г. ВОЗ зарегистрировано 90 случаев заражения людей птичьим гриппом А(H9N2), включая 2 смертельных случая (оба на фоне сопутствующих заболеваний). Из них 88 случаев – в Китае и 2 – в Камбодже. Последний случай зарегистрирован в Китае 22 июня 2023 г. [8]. До настоящего времени на территории России не зафиксировано ни одного случая заболевания человека, вызванного вирусами А(H5Nx), А(H7N9), А(H9N2).

В ГНЦ ВБ «Вектор» проводятся исследования высокопатогенного вируса гриппа, идентифицированного и/или выделенного на территории Российской Федерации. Частью этой программы является мониторинг маркеров вирусов гриппа с пандемическим потенциалом в сыворотках крови людей, имевших контакт с больной и/или погибшей птицей, а также жителей регионов, где наиболее вероятно появление вирусов с пандемическим потенциалом.

В 2021–2023 гг. на территории России зафиксированы вспышки высокопатогенного гриппа птиц, вызванные вирусом субтипа А(H5N1) клады

2.3.4.4 [9]. Тем не менее только единичные образцы сыворотки крови людей, собранные в 2021–2023 гг., взаимодействовали в РТГА с вирусами субтипов А/Н5Nх, но были отрицательными в реакции нейтрализации. Это позволяет предположить, что на территории России нет стабильной циркуляции среди людей вирусов зоонозного гриппа субтипов А(Н5N8) и А(Н5N1).

Еще одна серьезная проблема для здравоохранения связана с низкопатогенным вирусом гриппа птиц А(Н9N2). Большинство случаев заражения людей этим вирусом подтверждены у детей. В большинстве случаев контакт с домашней птицей подтвержден как вероятный источник патогена. Многочисленные данные показывают высокие уровни серопозитивности среди птицеводов во многих энзоотических странах, включая Индию, Камбоджу, Китай, Вьетнам, Египет, Гонконг, Иран, Таиланд и Пакистан [10].

По-видимому, в России инфекции А/Н9N2 также протекают в основном в легкой форме или бессимптомно и не передаются дальше, что можно объяснить плохой (на сегодняшний день) адаптацией вирусов А(Н9N2) к человеку. При этом положительные в РТГА образцы сыворотки крови, собранные в 2021–2023 гг., были положительными и в реакции нейтрализации.

Эксперты полагают, что с вирусом А/Н9N2 может быть связано появление будущего пандемического штамма. Так, ретроспективно было показано, что вирус А/Н5N1, вызвавший вспышку в 1997 г. в Гонконге, получил все гены, кроме генов НА и NA, от совместно циркулировавших вирусов А/Н9N2. Начиная с 2013 г. рекомбинация между вирусами А/Н9N2 генетической линии G57 и другими циркулирующими подтипами привела к образованию множества зоонозных вирусов гриппа Н7N9, Н10N8 и Н5N6 с высокой смертностью при заболевании людей [11]. Каждый из этих вирусов содержит шесть генов вируса А/Н9N2. Кроме того, несколько высокопатогенных вирусов А/Н5Nх содержат один или несколько генов из А/Н9N2. Помимо передачи своих генов, было несколько случаев, когда вирусы А/Н9N2 получали отдельные или множественные комбинации генов от других вирусов птичьего гриппа. Например, известно, что преобладающая линия А/Н9N2, циркулирующая в Пакистане и Бангладеш, получила несколько генов от высокопатогенных вирусов А/Н7N3 и А/Н5N1 [12]. По-видимому, широкое распространение вирусов А/Н9N2 может способствовать появлению будущих пандемических штаммов вируса гриппа.

Несмотря на отсутствие устойчивой циркуляции вирусов гриппа А/Н9N2 среди населения России, наблюдается постепенное увеличение количества образцов сыворотки крови людей, имеющих нейтрализующие антитела к этому субтипу вируса гриппа.

Таким образом, предотвратить появление новых вариантов вируса гриппа А мы не можем. Но отследить появление зоонозных вирусов, которые посте-

пенно адаптируются к человеку, – вполне посильная задача. Для этого Роспотребнадзором создана система надзора за появлением пандемических штаммов вируса гриппа, в которую составной частью входит исследование сывороток человека на присутствие антител к вирусам зоонозного гриппа.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Ilyicheva T., Sobolev I., Susloparov I., Kurskaya O., Durymanov A., Sharshov K., Shestopalov A. Monitoring of influenza viruses in Western Siberia in 2008–2012. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 20:177–87. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.08.025.
2. Ilyicheva T.N., Durymanov A.G., Svyatchenko S.V., Marchenko V.Y., Sobolev I.A., Bakulina A.Y., Goncharova N.I., Kolosova N.P., Susloparov I.M., Pyankova O.G., Ryzhikov A.B., Maksyutov R.A. Humoral immunity to influenza in an at-risk population and severe influenza cases in Russia in 2016–2017. *Arch. Virol.* 2018; 163(10):2675–85. DOI: 10.1007/s00705-018-3904-9.
3. Pyankova O.G., Susloparov I.M., Moiseeva A.A., Kolosova N.P., Onkhonova G.S., Danilenko A.V., Vakalova E.V., Shendo G.L., Nekeshina N.N., Noskova L.N., Demina J.V., Frolova N.V., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Ryzhikov A.B. Isolation of clade 2.3.4.4b A(H5N8), a highly pathogenic avian influenza virus, from a worker during an outbreak on a poultry farm, Russia, December 2020. *Euro Surveill.* 2021; 26(24):2100439. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100439.
4. Ильичева Т.Н., Нетёсов С.В., Гуреев В.Н. Вирусы гриппа. Методы. Новосибирск: ИПЦ НГУ; 2019. 258 с.
5. AbuBakar U., Amrani L., Kamarulzaman F.A., Karsani S.A., Hassandarvish P., Khairat J.E. Avian influenza virus tropism in humans. *Viruses*. 2023; 15(4):833. DOI: 10.3390/v15040833.
6. Lazniewski M., Dawson W.K., Szczepinska T., Plewczynski D. The structural variability of the influenza A hemagglutinin receptor-binding site. *Brief. Funct. Genom.* 2018; 17(6):415–27. DOI: 10.1093/bfpg/elt042.
7. Russell C.J., Hu M., Okda F.A. Influenza hemagglutinin protein stability, activation, and pandemic risk. *Trends Microbiol.* 2018; 26(10):841–53. DOI: 10.1016/j.tim.2018.03.005.
8. WHO. Avian Influenza Weekly Update Number 914. 22 September 2023. [Электронный ресурс]. URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wpro---documents/emergency/surveillance/avian-influenza/ai_20230922.pdf?sfvrsn=5f006f99_120.
9. Марченко В.Ю., Святченко С.В., Онхонова Г.С., Гончарова Н.И., Рыжиков А.Б., Максютлов Р.А., Гаврилова Е.В. Обзор эпизоотологической ситуации по высокопатогенному гриппу птиц в России и мире в 2022 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 1:48–55. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-48-55.
10. Khan S.U., Anderson B.D., Heil G.L., Liang S., Gray G.C. A systematic review and meta-analysis of the seroprevalence of influenza A(H9N2) infection among humans. *J. Infect. Dis.* 2015; 212(4):562–9. DOI: 10.1093/infdis/jiv109.
11. Liu K., Ding P., Pei Y., Gao R., Han W., Zheng H., Ji Z., Cai M., Gu J., Li X., Gu M., Hu J., Liu X., Hu S., Zhang P., Wang X., Wang X., Liu X. Emergence of a novel reassortant avian influenza virus (H10N3) in Eastern China with high pathogenicity and respiratory droplet transmissibility to mammals. *Sci. China. Life Sci.* 2022; 65(5):1024–35. DOI: 10.1007/s11427-020-1981-5.
12. Marinova-Petkova A., Shanmuganatham K., Feeroz M.M., Jones-Engel L., Hasan M.K., Akhtar S., Turner J., Walker D., Seiler P., Franks J., McKenzie P., Krauss S., Webby R.J., Webster R.G. The continuing evolution of H5N1 and H9N2 influenza viruses in Bangladesh between 2013 and 2014. *Avian Dis.* 2016; 60(1 Suppl.):108–17. DOI: 10.1637/11136-050815-Reg.

References

1. Ilyicheva T., Sobolev I., Susloparov I., Kurskaya O., Durymanov A., Sharshov K., Shestopalov A. Monitoring of influenza viruses in Western Siberia in 2008–2012. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 20:177–87. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.08.025.
2. Ilyicheva T.N., Durymanov A.G., Svyatchenko S.V., Marchenko V.Y., Sobolev I.A., Bakulina A.Y., Goncharova N.I., Kolosova N.P., Susloparov I.M., Pyankova O.G., Ryzhikov A.B., Maksyutov R.A. Humoral immunity to influenza in an at-risk popu-

lation and severe influenza cases in Russia in 2016–2017. *Arch. Virol.* 2018; 163(10):2675–85. DOI: 10.1007/s00705-018-3904-9.

3. Pyankova O.G., Susloparov I.M., Moiseeva A.A., Kolosova N.P., Onkhonova G.S., Danilenko A.V., Vakalova E.V., Shendo G.L., Nekeshina N.N., Noskova L.N., Demina J.V., Frolova N.V., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Ryzhikov A.B. Isolation of clade 2.3.4.4b A(H5N8), a highly pathogenic avian influenza virus, from a worker during an outbreak on a poultry farm, Russia, December 2020. *Euro Surveill.* 2021; 26(24):2100439. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100439.

4. Ilyicheva T.N., Netesov S.V., Gureev V.N. [Influenza Viruses. Methods]. Novosibirsk: Printing and Publishing House of Novosibirsk State University; 2019. 258 p.

5. AbuBakar U., Amrani L., Kamarulzaman F.A., Karsani S.A., Hassandarvish P., Khairat J.E. Avian influenza virus tropism in humans. *Viruses.* 2023; 15(4):833. DOI: 10.3390/v15040833.

6. Lazniewski M., Dawson W.K., Szczepinska T., Plewczynski D. The structural variability of the influenza A hemagglutinin receptor-binding site. *Brief. Funct. Genom.* 2018; 17(6):415–27. DOI: 10.1093/bfpg/ely042.

7. Russell C.J., Hu M., Okda F.A. Influenza hemagglutinin protein stability, activation, and pandemic risk. *Trends Microbiol.* 2018; 26(10):841–53. DOI: 10.1016/j.tim.2018.03.005.

8. WHO. Avian Influenza Weekly Update Number 914. 22 September 2023. [Internet]. Available from: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wpro---documents/emergency/surveillance/avian-influenza/ai_20230922.pdf?sfvrsn=5f006f99_120.

9. Marchenko V.Yu., Svyatchenko S.V., Onkhonova G.S., Goncharova N.I., Ryzhikov A.B., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. [Review on the epizootiological situation on highly pathogenic avian influenza around the world and in Russia in 2022]. *Problemy Osobo*

Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2023; (1):48–55. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-48-55.

10. Khan S.U., Anderson B.D., Heil G.L., Liang S., Gray G.C. A systematic review and meta-analysis of the seroprevalence of influenza A(H9N2) infection among humans. *J. Infect. Dis.* 2015; 212(4):562–9. DOI: 10.1093/infdis/jiv109.

11. Liu K., Ding P., Pei Y., Gao R., Han W., Zheng H., Ji Z., Cai M., Gu J., Li X., Gu M., Hu J., Liu X., Hu S., Zhang P., Wang X., Wang X., Liu X. Emergence of a novel reassortant avian influenza virus (H10N3) in Eastern China with high pathogenicity and respiratory droplet transmissibility to mammals. *Sci. China. Life Sci.* 2022; 65(5):1024–35. DOI: 10.1007/s11427-020-1981-5.

12. Marinova-Petkova A., Shanmuganatham K., Feeroz M.M., Jones-Engel L., Hasan M.K., Akhtar S., Turner J., Walker D., Seiler P., Franks J., McKenzie P., Krauss S., Webby R.J., Webster R.G. The continuing evolution of H5N1 and H9N2 influenza viruses in Bangladesh between 2013 and 2014. *Avian Dis.* 2016; 60(1 Suppl.):108–17. DOI: 10.1637/11136-050815-Reg.

Authors:

Ilyicheva T.N., Moiseeva A.A., Ivanova K.I., Azaev M.Sh., Marchenko V.Yu. State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol’tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Об авторах:

Ильичева Т.Н., Моисеева А.А., Иванова К.И., Азаев М.Ш., Марченко В.Ю. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Колыцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-84-90

УДК 616-022.14(597)

Le Thi Lan Anh¹, Ta Thi Loan¹, Dinh Thu Minh², Vu Thi Thuong¹, Pham Thi Ha Giang¹,
Bui Thi Thanh Nga¹, Pham Viet Hung¹, Nguyen Ngoc Tan¹, Trieu Phi Long³, Le Thi Van Anh⁴,
Hoang Dang Hieu¹

**Antibiotic Resistance Patterns in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC),
Salmonella, *Shigella* and *Staphylococcus aureus* Isolated at Two Communal Kitchens
Located in Hanoi City, Vietnam**

¹Institute of Tropical Medicine, Joint Vietnam-Russia Tropical Science and Technology Research Center, Hanoi, Vietnam;

²Hanoi University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam;

³Military Institute of Preventive Medicine, Hanoi, Vietnam;

⁴Publishing House for Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

Abstract. The aim of our study was to investigate the antibiotic resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella* spp., *Shigella* spp., and *Staphylococcus aureus* strains. **Materials and methods.** 660 samples were collected at two communal kitchens in Hanoi, Vietnam between 2021 and 2022. They included foodstuffs, environmental (food processing tools) and biological ones (swabs from the hands of personnel). The VITEK® 2 Compact system in combination with DNA sequencing was used to identify bacterial species. The antibiotic susceptibility test (AST) was performed according to Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility protocol following Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) method (M100-Ed32). **Results and discussion.** In total, 53 pathogenic bacterial strains have been detected, including 11 STEC, 24 *Salmonella enterica*, 9 *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, and 8 *S. aureus*. AST of STEC has showed the highest resistance rates to tetracycline and chloramphenicol (90.9 %); trimethoprim+sulfamethoxazole (81.8 %); ampicillin, gentamycin and piperacillin (63.6 %). The STEC isolates were susceptible to carbapenem group. Among the *Salmonella* strains, 50 % demonstrated resistance to ampicillin, followed by tetracycline and piperacillin (45.8 %). Additionally, 25 % were resistant to ticarcillin+clavulanic acid, 20.8 % – to trimethoprim+sulfamethoxazole, and 16.7 % – to chloramphenicol. All *Salmonella* strains exhibited susceptibility to gentamicin, cefoxitin, imipenem, meropenem, and ceftazidime. AST of *Shigella* strains revealed the highest resistance rate for tetracycline (30 %), followed by cefazolin and ceftazidime (20 %). However, all *Shigella* strains were susceptible to cefoxitin, carbapenem groups, and chloramphenicol. Among the *S. aureus* strains, 50 % exhibited resistance to erythromycin, azithromycin, clindamycin, penicillin, telithromycin, and gentamicin, followed by ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, and chloramphenicol (25 %). All *S. aureus* strains were still susceptible to trimethoprim+sulfamethoxazole, daptomycin, linezolid, doxycycline, minocycline, and vancomycin. Our findings reflect the current situation on antibiotic resistance among pathogenic bacteria strains circulating at the study sites during food processing. They are an evidence of potential risk of food poisoning. There is a need to undertake the proper containment measures on the part of authorities or policy makers.

Key words: Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance pattern.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Bioethics: The study was approved by the Ethics Committee in Biomedical Research of the Vietnam-Russia Tropical Center No. 1536/CN-HĐĐĐ dated May 24, 2021.

Acknowledgements: We would like to thank the Molecular Biology Laboratory, Institute of Tropical Medicine, Joint Vietnam-Russia Tropical Science and Technology Research Center for supporting us in conducting this study.

Corresponding author: Le Thi Lan Anh, e-mail: leanhbio@gmail.com.

Citation: Le Thi Lan Anh, Ta Thi Loan, Dinh Thu Minh, Vu Thi Thuong, Pham Thi Ha Giang, Bui Thi Thanh Nga, Pham Viet Hung, Nguyen Ngoc Tan, Trieu Phi Long, Le Thi Van Anh, Hoang Dang Hieu. Antibiotic Resistance Patterns in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella*, *Shigella* and *Staphylococcus aureus* Isolated at Two Communal Kitchens Located in Hanoi City, Vietnam. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:84–90. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-84-90

Received 21.09.2023. Revised 05.10.2023. Accepted 24.10.2023.

Le Thi Lan Anh, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5927-9857>
Ta Thi Loan, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2586-0122>
Dinh Thu Minh, ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-8410-3612>
Vu Thi Thuong, ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-3664-080X>
Pham Thi Ha Giang, ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-9309-6108>
Bui Thi Thanh Nga, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4119-1339>

Pham Viet Hung, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8622-9935>
Nguyen Ngoc Tan, ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-3969-4361>
Trieu Phi Long, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2472-6370>
Le Thi Van Anh, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7413-2802>
Hoang Dang Hieu, ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-6679-7381>

Le Thi Lan Anh¹, Ta Thi Loan¹, Dinh Thu Minh², Vu Thi Thuong¹, Pham Thi Ha Giang¹,
Bui Thi Thanh Nga¹, Pham Viet Hung¹, Nguyen Ngoc Tan¹, Trieu Phi Long³, Le Thi Van Anh⁴,
Hoang Dang Hieu¹

Профили антибиотикорезистентности у шига-токсин-продуцирующей *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella*, *Shigella* и *Staphylococcus aureus*, выделенных на двух общественных кухнях, расположенных в городе Ханой, Вьетнам

¹Институт тропической медицины Совместного Вьетнамско-Российского тропического научно-исследовательского и технологического центра, Ханой, Вьетнам;

²Ханойский исследовательский университет, Вьетнамский национальный университет, Ханой, Вьетнам;

³Военный институт профилактической медицины, Ханой, Вьетнам;

⁴Издательство науки и технологий, Вьетнамская академия наук и технологий, Ханой, Вьетнам

Целью нашего исследования являлось изучение профилей устойчивости к антибиотикам штаммов шига-токсин-продуцирующих *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella* spp., *Shigella* spp. и *Staphylococcus aureus*. **Материалы и методы.** В период с 2021 по 2022 г. на двух общественных кухнях в Ханое, Вьетнам, было собрано 660 образцов. Они включали в себя образцы пищевых продуктов, внешней среды (предметы для обработки пищи) и биологические образцы (смывы с рук персонала). Для идентификации видов бактерий использовали систему VITEK® 2 Compact, наряду с секвенированием ДНК. Тест на чувствительность к антибиотикам (AST) проводился в соответствии с протоколом Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility по методу Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) (M100-Ed32). **Результаты и обсуждение.** Всего выявлено 53 штамма патогенных бактерий, в том числе 11 STEC, 24 *Salmonella enterica*, 9 *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* и 8 *S. aureus*. AST STEC выявил наиболее высокий уровень резистентности к тетрациклину и хлорамфениколу (90,9 %); триметоприму+сульфаметоксазолу (81,8 %); ампициллину, гентамицину и пиперациллину (63,6 %). Изоляты STEC проявили чувствительность к группе карбапенемов. Среди штаммов сальмонелл 50 % устойчивы к ампициллину. Вторую позицию занимали тетрациклин и пиперациллин (45,8 %). При этом 25 % были устойчивы к тикарциллину+клавулановой кислоте, 20,8 % – к триметоприму+сульфаметоксазолу и 16,7 % – к левомицетину. Все штаммы сальмонелл проявляли чувствительность к гентамицину, цефокситину, имипенему, меропенему и цефтазидиму. AST штаммов *Shigella* spp. показал самый высокий уровень устойчивости к тетрациклину (30 %), цефазолину и цефтазидиму (20 %). Однако все штаммы шигелл были чувствительны к цефокситину, группам карбапенемов и хлорамфениколу. Среди штаммов *S. aureus* 50 % проявили устойчивость к эритромицину, азитромицину, клиндамицину, пенициллину, телитромицину и гентамицину, а 25 % – к ципрофлоксацину, моксифлоксацину, левофлоксацину и хлорамфениколу. Однако все штаммы *S. aureus* проявили чувствительность к триметоприму+сульфаметоксазолу, даптомицину, линезолиду, доксициклину, миноциклину и ванкомицину. Полученные нами результаты отражают текущее положение дел касательно устойчивости к антибиотикам среди штаммов патогенных бактерий, циркулирующих на объектах исследования при переработке пищевых продуктов. Они являются свидетельством потенциального риска пищевого отравления. Существует необходимость принятия надлежащих мер по контролю над патогенными агентами со стороны властей и руководящих органов.

Ключевые слова: шига-токсин-продуцирующие *E. coli* (STEC), *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, профили антибиотикорезистентности.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Биоэтика. Исследование одобрено Комитетом по этике биомедицинских исследований Вьетнамско-Российского тропического центра № 1536/CN-HĐĐĐ от 24 мая 2021 г.

Благодарность. Мы бы хотели поблагодарить Лабораторию молекулярной биологии Института тропической медицины Объединенного Вьетнамско-Российского научно-исследовательского тропического центра науки и технологий за поддержку в проведении данного исследования.

Корреспондирующий автор: Le Thi Lan Anh, e-mail: leanhbio@gmail.com.

Для цитирования: Le Thi Lan Anh, Ta Thi Loan, Dinh Thu Minh, Vu Thi Thuong, Pham Thi Ha Giang, Bui Thi Thanh Nga, Pham Viet Hung, Nguyen Ngoc Tan, Trieu Phi Long, Le Thi Van Anh, Hoang Dang Hieu. Профили антибиотикорезистентности у шига-токсин-продуцирующей *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella*, *Shigella* и *Staphylococcus aureus*, выделенных на двух общественных кухнях, расположенных в городе Ханой, Вьетнам. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:84–90. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-84–90

Поступила 21.09.2023. Отправлена на доработку 05.10.2023. Принята к публ. 24.10.2023.

Gastroenteritis is widespread all over the world. The most common causes of it are bacteria, including STEC, *Salmonella*, *Shigella* and *Staphylococcus aureus* [1]. In Vietnam, children with gastroenteritis and other food poisoning conditions caused by *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* infections have been reported [2].

Shiga toxin producing *Escherichia coli* is a major factor of food-borne illnesses [3, 4]. Data from the World

Health Organization (WHO) show that STEC strains cause 2.5 million cases each year, of which 1.2 million are food-borne ones [5].

Salmonella spp. is accountable for nearly one-third of food-borne infection outbreaks in the European Union. In 2018, EU member states documented 5,146 food-borne illness outbreaks, affecting 48,365 people. Out of those, 1,581 outbreaks were attributed to *Salmonella*

spp. Annually, *Salmonella* bacteria cause approximately 68,000 deaths [6].

According to WHO, there are an estimated 80 million cases of shigellosis worldwide each year with approximately 700,000 deaths happening annually as a result of this infection [7]. Four species of *Shigella* have been identified: *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii*, and *S. dysenteriae*. *S. sonnei* is widespread in Vietnam and Thailand, whereas *S. flexneri* is abundant in Indonesia and Cambodia [8].

Staphylococcus aureus also creates a burden of food-borne diseases, with approximately 241,000 cases estimated to occur annually in the United States. However, the actual number of cases caused by *S. aureus* may be significantly higher as sporadic cases of the disease are not reported in the United States [9].

Antibiotic resistance of *Salmonella*, *Shigella* and *S. aureus* strains isolated from the environment and biological samples such as foodstuffs, swabs from the surface of processing equipment, material from under fingernails, and stool samples has been reported globally. In particular, the rate of strains resistant to tetracycline, ampicillin, and chloramphenicol is increasingly common [10, 11].

Contamination with *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* and *S. aureus* of food from retail markets and canteens have been reported in Vietnam [12, 13]. Cases of food poisoning at the communal kitchens of industrial parks or at schools have become frequent in recent years. In this context, training in food safety control at communal kitchens, as well as surveillance studies on the prevalence of strains of food-borne infectious agents, including STEC, *Salmonella*, *Shigella* and *S. aureus* play an important role in minimizing poisoning incidents.

This work is devoted to the assessment of the antibiotic resistance in STEC, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., and *S. aureus* strains collected at two communal kitchens in Hanoi city, Vietnam. The study describes the strains with multi-drug resistance.

Materials and methods

Study setting. In 2021 and 2022, we conducted surveillance at two communal kitchens, which process food for staff of two industrial companies located in Hanoi city, Vietnam. The survey was performed as part of routine food safety inspection.

Sample collection. A total of 660 samples, including food samples (501), swabs from the surface of pro-

cessing tools (100), surface of dining tables (25), swabs from the hands of food processors (34) were collected.

As regards food samples, we gathered 25 g of material (vegetables, meat and seafood) at the study site. Then, samples were placed in a sterile specialized plastic zip bag and stored at 4 °C to 10 °C in a designated sample transport box. Collected samples were transferred to the laboratory within 2 hours from the time of collection. Samples were individually labeled, recording time, location, and type.

Swabs were taken from surface of tables, knives, bowls, cutting boards, and hands of food processors. We used a sterile cotton swab dipped in 10 % peptone buffered water solution to wipe both sides of the tools and hands. After that, the cotton pad was put in a sterile test tube and store at 4 °C to 10 °C in an allocated sample transport box.

Culture isolation and identification of STEC, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., and *S. aureus*. Isolation of STEC, *Salmonella*, and *Shigella* was performed according to the ISO 21567:2004 and ISO 6579-1:2017 with some modifications. MacConkey agar (Oxoid; UK) and CHROMagar STEC (CHROMagar™, France) were used for isolation of STEC [14], HE agar (Oxoid; UK) and CHROMagar™ *Salmonella* – for *Salmonella* spp. [15], and *Salmonella shigella* agar (SS agar) (Oxoid; UK) and HE agar – for *Shigella* spp. CHROMagar™ Staph was used for *S. aureus* [16]. The suspicious colonies were identified using the Vitek 2 compact automatic identification system.

All specified bacterial strains were seeded onto TSB medium (Oxoid; UK) for downflow DNA extracting using a genomic DNA isolation kit (QIAGEN, Germany) and PCR amplification of STEC, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., and *S. aureus* genomic fragments. The primer sequences and PCR results are shown in the Table 1. PCR products were investigated with the help of electrophoresis in 1.5 % agarose gel. In order to confirm the identification of isolated strains, PCR products were sent to Macrogen Company (Korea) for DNA sequencing using Sanger method.

Antibiotic susceptibility testing. The antibiotic susceptibility test was performed using Kirby-Bauer methodology. For quality control, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica typhi* ATCC 14028, *Shigella sonnei* (Levine) Weldin (ATCC® 25931™), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were used according to QC standard for Disc Diffusion Antibigram of CLSI's document version 2022. The following an-

Table 1

List of oligonucleotide primers used in this study

Target gene	Primer	Primer sequence (5'-3')	PCR product size (bp)	Annealing temperature/time (°C/s)	References
Gyrase B	F1	gaagtcacatgaccgttctgca	1200	60/15	[17]
	R1	gcagggtacggatgtcgagcc			
16s rRNA	F2	agagtttgatcctggctcag	1250	49/15	[18]
	R2	ggttaccttggttacgactt			

tibiotics (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) were applied for STEC, *Shigella* spp. and *Salmonella* spp.: Ampicillin (AMP 10 µg), Cefazolin (CZ 30 µg), Gentamicin (CN 10 µg), Tobramycin (TOB 10 µg), Amikacin (AK 30 µg), Amoxicillin+Acid clavulanic (AMC 30 µg), Ampicillin+Sulbactam (SAM 20 µg), Piperacillin+Tazobactam (TZP 110 µg), Ticarcillin+Clavulanic (TIM 85 µg), Cefuroxime (CXM 30 µg), Cefepime (FEP 30 µg), Cefoxitin (FOX 30 µg), Ciprofloxacin (CIP 5 µg), Levofloxacin except *Salmonella* spp. (LEV 5 µg), Ertapenem (ETP 10 µg), Imipenem (IPM 10 µg), Meropenem (MEM 10 µg), Piperacillin (PRL 100 µg), Trimethoprim+Sulfamethoxazole (SXT 25 µg), Aztreonam (ATM 30 µg), Ceftazidime (CAZ 30 µg), Chloramphenicol (C 30 µg). The antibiotics used for *S. aureus* isolates were Erythromycin (E 15 µg), Azithromycin (AZM 15 µg), Clindamycin (DA 2 µg), Cefoxitin (FOX 30 µg), Penicillin (P 10 µg), Trimethoprim+Sulfamethoxazole (SXT 25 µg), Linezolid (LZD 30 µg), Telithromycin (TEL 15 µg), Doxycycline (DO 30 µg), Minocycline (MH 30 µg), Tetracycline (TE 30 µg), Chloramphenicol (C 30 µg), Ciprofloxacin (CIP 5 µg), Moxifloxacin (MXF 5 µg), Gentamicin (CN 10 µg), Levofloxacin (LEV 5 µg). The strains were designated sensitive (S), moderately sensitive (M), or resistant (R) in compliance with CLSI guidelines (M100-Ed32).

Results and discussion

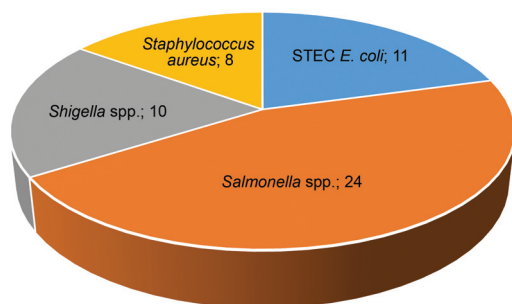
Identification of STEC, *Salmonella*, *Shigella* and *S. aureus*. In this study, we detected 53 pathogenic bacterial strains, including 11 STEC, 24 *Salmonella* spp., 10 *Shigella* spp., and 8 strains of *S. aureus*, using conventional microbiology method. The gyrase B gene-based sequencing showed that 24 *Salmonella* spp. strains belonged to *Salmonella enterica*. Out of 10 *Shigella* spp. strains, nine were identified as *Shigella sonnei* and one was *Shigella flexneri* according to DNA sequencing (Figure).

Antibiotic susceptibility testing of isolated strains. The results of AST of STEC, *Salmonella* spp., and *Shigella* spp. strains are described in detail in Table 2. We have established that 11 STEC isolates exhibited susceptibility to cefoxitin, ertapenem, imipenem, and meropenem antibiotics. Conversely, those strains displayed the highest resistance to tetracycline and chloramphenicol – 90.9 %

(10 out of 11 strains). Trimethoprim+sulfamethoxazole occupied the second place, with 9 out of 11 strains exhibiting resistance (81.8 %). Resistance to ampicillin, gentamicin, and piperacillin was 63.6 % (7 out of 11 strains), 45.5 % for cefazolin (5 out of 11), 36.4 % for cefuroxime, cefepime, cefotaxime, and aztreonam (4 out of 11), and 27.3 % for ciprofloxacin and tobramycin (3 out of 11). Importantly, 81.8 and 54.5 % of STEC strains showed moderate susceptibility to amikacin and ticarcillin+clavulanic, respectively. Additionally, 10 out of 11 STEC strains showed multidrug resistance to 9–13 different antibiotics, while only one strain was sensitive to 23 out of 24 tested antimicrobials and moderately sensitive to 1 antibiotic. Regarding the test results for 24 isolates of *Salmonella* spp., it was found that all of them were sensitive to gentamicin, cefoxitin, imipenem, meropenem, and ceftazidime. The highest resistance rate of 50 % (12 strains) was in the response to ampicillin, followed by tetracycline and piperacillin in 11 out of 24 strains (45.8 %), ticarcillin+clavulanic acid in 6 out of 24 strains (25 %), trimethoprim+sulfamethoxazole in 5 out of 24 strains (20.8 %), chloramphenicol in 4 out of 24 strains (16.7 %). Resistance levels were lower for piperacillin+tazobactam in 2 out of 24 strains (8.3 %), cefazolin, ampicillin+sulbactam, cefoxitin, ciprofloxacin, ertapenem, and aztreonam in 1 out of 24 strains (4.2 %). 7.5 % of *Salmonella* strains were moderately susceptible to cefazolin. Among them, 12 out of 24 strains exhibited multidrug resistance to 3–8 different antibiotics. Moreover, our findings indicate that all 10 isolated *Shigella* strains were sensitive to antibiotics including cefoxitin, ertapenem, imipenem, meropenem, and chloramphenicol. The *Shigella* strains demonstrated the highest resistance to tetracycline (30 %), followed by cefazolin, ceftazidime at 20 %, and cefuroxime, cefepime, ampicillin, gentamicin, ticarcillin+clavulanic acid, trimethoprim+sulfamethoxazole, and aztreonam in one out of 10 strains (10 %). 40 % of *Shigella* isolates were moderately susceptible to piperacillin+tazobactam. Only one *Shigella* strain showed multidrug resistance to 10 different antibiotics. It is of interest that STEC, *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. were susceptible to 3 out of 24 tested antibiotics (cefepime, imipenem and meropenem).

Regarding *S. aureus* strains, the AST revealed the highest resistance to erythromycin, azithromycin, clindamycin, penicillin, telithromycin, and gentamicin in 4 out of 8 strains (50 %). The second position is occupied by ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, and chloramphenicol – 2 out of 8 strains (25 %) (Table 3). All 8 isolated *S. aureus* strains were sensitive to 5 out of 18 tested antibiotics including daptomycin, doxycycline, minocycline, linezolid, vancomycin, and trimethoprim+sulfamethoxazole. Additionally, out of 8 isolated strains of *S. aureus*, 5 strains exhibited multidrug resistance, ranging from 2 to 5 different types of antibiotics.

Contamination with STEC, *Salmonella*, *Shigella* and *S. aureus* is one of the main causes of food poisoning. Therefore, food safety control and regular monitoring of



Proportion of isolated bacterial strains

Table 2

Antibiotic resistance patterns of isolated bacteria

Antibiotics	STEC			<i>Salmonella</i> spp.			<i>Shigella</i> spp.		
	R, %	M, %	S, %	R, %	M, %	S, %	R, %	M, %	S, %
Ampicillin	63.6	0.0	36.4	50.0	0.0	50.0	10.0	0.0	90.0
Piperacillin	63.6	9.1	27.3	45.8	4.2	50.0	10.0	10.0	80.0
Aztreonam	36.4	9.1	54.5	4.2	0.0	95.8	10.0	0.0	90.0
Amikacin	9.1	81.8	9.1	0.0	4.2	95.8	0.0	10.0	90.0
Gentamicin	63.6	0.0	36.4	0.0	0.0	100	10.0	0.0	90.0
Tobramycin	27.3	18.2	54.5	0.0	8.3	91.7	0.0	10.0	90.0
Cefazolin	45.5	9.1	45.5	4.2	37.5	58.3	20.0	20.0	60.0
Cefuroxime	36.4	0.0	63.6	0.0	12.5	87.5	10.0	0.0	90.0
Cefepime	36.4	0.0	63.6	0.0	8.3	91.7	10.0	0.0	90.0
Ceftazidime	18.2	9.1	72.7	0.0	0.0	100	20.0	0.0	80.0
Chloramphenicol	90.9	0.0	9.1	16.7	0.0	83.3	0.0	0.0	100
Cefoxitin	0.0	0.0	100	0.0	0.0	100	0.0	0.0	100
Cefotaxime	36.4	9.1	54.5	4.2	8.3	87.5	10.0	10.0	80.0
Ciprofloxacin	27.3	27.3	45.5	4.2	29.2	66.7	0.0	20.0	80.0
Levofloxacin	18.2	9.1	72.7	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	80.0
Ertapenem	0.0	0.0	100	4.2	0.0	95.8	0.0	0.0	100
Imipenem	0.0	0.0	100	0.0	0.0	100	0.0	0.0	100
Meropenem	0.0	0.0	100	0.0	0.0	100	0.0	0.0	100
Tetracyclin	90.9	0.0	9.1	45.8	0.0	54.2	30.0	0.0	70.0
Amoxicillin+Acid clavulanic	0.0	18.2	81.8	0.0	8.3	91.7	0.0	10.0	90.0
Ampicillin+Sulbactam	18.2	9.1	72.7	4.2	16.7	79.2	0.0	10.0	90.0
Piperacillin+Tazobactam	0.0	18.2	81.8	8.3	29.2	62.5	0.0	40.0	60.0
Ticarcillin+Clavulanic	0.0	54.5	45.5	25.0	0.0	75.0	10.0	0.0	90.0
Trimethoprim+Sulfamethazole	81.8	0.0	18.2	20.8	0.0	79.2	10.0	0.0	90.0

Note: R – resistant, S – susceptible, M – moderately susceptible.

Table 3

Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolates

Antibiotics	R, %	M, %	S, %
Azithromycin	50.0	0.0	50.0
Erythromycin	50.0	0.0	50.0
Clindamycin	50.0	0.0	50.0
Cefoxitin	0.0	12.5	87.5
Chloramphenicol	25.0	0.0	75.0
Ciprofloxacin	25.0	0.0	75.0
Levofloxacin	25.0	0.0	75.0
Moxifloxacin	25.0	0.0	75.0
Daptomycin	0.0	0.0	100
Doxycycline	0.0	0.0	100
Minocycline	0.0	0.0	100
Tetracyclin	0.0	25	75.0
Gentamicin	50.0	0.0	50.0
Linezolid	0.0	0.0	100
Telithromycin	50.0	0.0	50.0
Penicillin	50.0	0.0	50.0
Vancomycin	0.0	0.0	100
Trimethoprim+Sulfamethazole	0.0	0.0	100

Note: R – resistant, S – susceptible, M – moderately susceptible.

hygiene and proper processing conditions play a significant role in containment of the infection. Currently, studies on the prevalence of pathogens (STEC, *Salmonella*, *Shigella*, *S. aureus*) are mainly conducted at retail markets and animal slaughter sites, but there is insufficient monitoring at communal kitchens. Over the past 5 years, reports of food poisoning caused by microorganisms in collective kitchens in industrial parks or at schools in Vietnam have been increasing. However, testing for the presence of microbial agents is only performed after a registered case of poisoning.

In this study, a total of 53 bacterial strains were collected at two communal kitchens located in Hanoi City, Vietnam. The majority of the isolates (24 strains) were identified as *Salmonella*. Next in the list were STEC strains (11), followed by *Shigella* (10 strains), and *Staphylococcus aureus* (8 strains). These findings suggest that *Salmonella* spp. are the most common agents at the two public kitchens in Hanoi. It is generally known that human infection with *Salmonella* mainly occurs through direct or indirect contact with infected animals and contaminated food products, including meat, poultry, raw milk, eggs, and water. Previously, it was reported that average rate of chicken meat contamination

with *Salmonella* in six regions of Vietnam was 45.9 %. In Hanoi City, it reached 51.1 % [12].

Transmission of pathogenic microorganisms and toxigenic agents through food has been recognized as a significant risk for many decades. The widespread resistance of bacteria to antibiotics is a major threat that leads to hundreds of thousands of deaths annually. One of the most alarming issues is the increasing number of bacteria that are resistant to commonly used antibiotics, including those considered as last-resort treatments. This concern was officially acknowledged by WHO in 2014 as a major global health challenge.

In our study, STEC demonstrated the highest resistance to currently used antibiotics. In comparison to a study by Tran Thi Le Trieu *et al.* on 24 surveyed *E. coli* strains, the highest resistance was observed to ampicillin (79.17 %), followed by streptomycin (62.50 %), and amoxicillin/clavulanic acid (54.17 %) [19]. Another study by B. González-Santamarina *et al.* on 23 *Salmonella* strains isolated from pig slaughterhouses and pork markets revealed the highest resistance to ampicillin (73.9 %) and piperacillin and moxifloxacin (both 69.6 %), followed by trimethoprim and trimethoprim with sulfamethoxazole (both 56.5 %) [20]. Research on *Salmonella* strains isolated from chickens and chicken farm environments in three households in Vinh Long province, Vietnam by Ho Xuan Yen *et al.*, showed the high rate of resistance to such antibiotics as ampicillin (100 %), chloramphenicol (95 %), cefuroxime, streptomycin, and tetracycline (90 %), and moderate resistance to doxycycline (85 %). They exhibited lower resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole (60 %) and had minimal resistance to colistin (25 %) [21].

The study of C.S. Toro *et al.* on 349 strains of *Shigella* revealed some interesting evidence: 100 % of the strains were found to be sensitive to ciprofloxacin. On the other hand, those strains demonstrated high level of resistance to other antibiotics. The resistance rates were as follows: streptomycin (305 strains, 87.4 %), trimethoprim (264 strains, 75.6 %), ampicillin (257 strains, 73.6 %), tetracycline (257 strains, 73.6 %), sulfamethoxazole/trimethoprim (256 strains, 73.3 %), and chloramphenicol (195 strains, 55.9 %) [22]. Resistance to tetracycline was observed in both *S. sonnei* and *S. flexneri* [23]. Furthermore, the study of S. Khaghani *et al.* indicated that at least 25 % of *S. flexneri* strains isolated from Abuzar Children's Hospital in Ahvaz, southwestern Iran exhibited resistance to three commonly prescribed antibiotics: ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole and nalidixic acid [24].

A recent study conducted by V. Velasco *et al.* on 55 strains of *Staphylococcus aureus* in Chile uncovered the fact that a significant number of the isolated strains showed resistance to penicillin (83.6 %). Moreover, a considerable proportion of the isolates, approximately 38.2 %, displayed resistance to multiple types of antibiotics [25].

Our research has demonstrated that the detected STEC, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., and *S. aureus*

strains exhibited significant resistance rate to several antibiotics such as tetracycline, ampicillin, penicillin. This result is consistent with other listed above studies that were previously carried out. However, it is noteworthy that certain antibiotics, such as cefoxitin, remain effective against all four groups of isolated bacteria. Additionally, all collected bacterial strains in this study were still sensitive to carbapenem such as imipenem, and meropenem. Furthermore, the combination of multiple antibiotics increased effectiveness of neutralization, as observed with combinations such as amoxicillin+clavulanic acid or trimethoprim+sulfamethoxazole, which increase sensitivity of bacterial strains. These findings highlight the potential benefits of utilizing appropriate antibiotic combinations to combat infections caused by indicated bacterial groups.

Summing up the above, we isolated a total of 53 strains from four different bacterial groups, STEC, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., and *Staphylococcus aureus*, collected at two communal kitchens in Hanoi city, Vietnam. Among these groups, *Salmonella* spp. was the predominant bacterial species, accounting for 24 strains. However, it is of note that STEC raises the highest level of concern as it exhibited resistance to certain antibiotics such as tetracycline and chloramphenicol, as high as 90.1 %. Additionally, out of the 11 STEC strains analyzed, 10 strains showed resistance to multiple antibiotics, indicating a multidrug-resistant phenotype. Thus, the design of kitchens and the training of personnel on food safety and hygiene practices play a pivotal role in mitigating the risk of transmission of pathogenic bacteria and preventing food-borne diseases.

Our findings reflect the current situation on antibiotic resistance in circulating pathogenic bacteria found at the study sites in the course of food processing. They evidence a potential risk of food poisoning and the need to take appropriate sanitary measures on the part of authorities or policy makers.

References

1. Dessale M., Mengistu G., Mengist H.M. Prevalence, antimicrobial resistance pattern, and associated factors of *Salmonella* and *Shigella* among under five diarrheic children attending public health facilities in Debre Markos town, Northwest Ethiopia. *Front. Public Health.* 2023; 11:1114223. DOI: 10.3389/fpubh.2023.1114223.
2. Carrique-Mas J.J., Bryant J.E. A review of foodborne bacterial and parasitic zoonoses in Vietnam. *Ecohealth.* 2013; 10(4):465–89. DOI: 10.1007/s10393-013-0884-9.
3. Havelaar A.H., Kirk M.D., Torgerson P.R., Gibb H.J., Hald T., Lake R.J., Praet N., Bellinger D.C., de Silva N.R., Gargouri N., Speybroeck N., Cawthorne A., Mathers C., Stein C., Angulo F.J., Devleesschauwer B.; World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS Med.* 2015; 12(12):e1001923. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001923.
4. Terajima J., Izumiya H., Hara-Kudo Y., Ohnishi M. Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* and foodborne disease: A review. *Food Saf. (Tokyo).* 2017; 5(2):35–53. DOI: 10.14252/foodsafetyfscj.2016029.
5. Kirk M.D., Pires S.M., Black R.E., Caipo M., Crump J.A., Devleesschauwer B., Döpfer D., Fazil A., Fischer-Walker C.L., Hald T., Hall A.J., Keddy K.H., Lake R.J., Lanata C.F., Torgerson P.R., Havelaar A.H., Angulo F.J. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis. *PLoS Med.* 2015; 12(12):e1001921. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001921.

6. Ao T.T., Feasey N.A., Gordon M.A., Keddy K.H., Angulo F.J., Crump J.A. Global burden of invasive nontyphoidal *Salmonella* disease, 2010(1). *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(6):941–9. DOI: 10.3201/eid2106.140999.
7. Puzari M., Sharma M., Chetia P. Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: A matter of concern. *J. Infect. Public Health.* 2018; 11(4):451–4. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.09.025.
8. Muzembo B.A., Kitahara K., Mitra D., Ohno A., Khatiwada J., Dutta S., Miyoshi S.I. Shigellosis in Southeast Asia: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med. Infect. Dis.* 2023; 52:102554. DOI: 10.1016/j.tmaid.2023.102554.
9. Kadariya J., Smith T.C., Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *Biomed Res. Int.* 2014; 2014:e827965. DOI: 10.1155/2014/827965.
10. Aklilu A., Kahase D., Dessalegn M., Tarekegn N., Gebremichael S., Zenebe S., Desta K., Mulugeta G., Mamuye Y., Mama M. Prevalence of intestinal parasites, salmonella and shigella among apparently health food handlers of Addis Ababa University student's cafeteria, Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Res. Notes.* 2015; 8:17. DOI: 10.1186/s13104-014-0967-x.
11. Bantawa K., Sah S.N., Subba Limbu D., Subba P., Ghimire A. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Vibrio* isolated from chicken, pork, buffalo and goat meat in eastern Nepal. *BMC Res. Notes.* 2019; 12(1):766. DOI: 10.1186/s13104-019-4798-7.
12. Ta Y.T., Nguyen T.T., To P.B., Pham Da X., Le H.T. H., Alali W.Q., Walls I., Lo Fo Wong D.M.A., Doyle M.P. Prevalence of *Salmonella* on chicken carcasses from retail markets in Vietnam. *J. Food Prot.* 2012; 75(10):1851–4. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-12-130.
13. Luu-Thi H., Michiels C.W. Microbiological safety of ready-to-eat foods in hospital and university canteens in Hanoi, Vietnam. *J. Food Prot.* 2021; 84(11):1915–21. DOI: 10.4315/JFP-20-324.
14. Jenkins C., Perry N.T., Godbole G., Gharbia S. Evaluation of chromogenic selective agar (CHROMagar STEC) for the direct detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from faecal specimens. *J. Med. Microbiol.* 2020; 69(3):487–91. DOI: 10.1099/jmm.0.001136.
15. Perez J.M., Cavalli P., Roure C., Renac R., Gille Y., Freydiere A.M. Comparison of four chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(3):1130–4. DOI: 10.1128/JCM.41.3.1130-1134.2003.
16. Gaillot O., Wetsch M., Fortineau N., Berche P. Evaluation of CHROMagar *Staph. aureus*, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(4):1587–91. DOI: 10.1128/JCM.38.4.1587-1591.2000.
17. Fukushima M., Kakinuma K., Kawaguchi R. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(8):2779–85. DOI: 10.1128/JCM.40.8.2779-2785.2002.
18. Saleh R.O., Raheema R.H., Jaafar Z. Phylogenetic tree and submission of *Staphylococcus aureus* isolate from skin infection. *J. Pure Appl. Microbiol.* 2018; 12(4):2199–204. DOI: 10.22207/JPAM.12.4.59.
19. Trần Thị Lệ Triệu, Nguyễn Khánh Thuận, Nguyễn Văn Toàn, Lâm Tuấn Kiệt, Lý Thị Liên Khai. Sự lây nhiễm và đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *Escherichia coli* trên thịt heo và môi trường tại cơ sở giết mổ thuộc huyện Châu Thành, tỉnh An Giang. *Can Tho University Journal of Science.* 2022; 58(1B):189–96.
20. González-Santamarina B., García-Soto S., Dang-Xuan S., Abdel-Gil M.Y., Meemken D., Fries R., Tomaso H. Genomic characterization of multidrug-resistant *Salmonella* serovars Derby and Rissen from the pig value chain in Vietnam. *Front. Vet. Sci.* 2021; 8:705044. DOI: 10.3389/fvets.2021.705044.
21. Hồ Xuân Yên, Nguyễn Khánh Thuận, Lý Thị Liên Khai. Khảo sát vi khuẩn *Salmonella* spp. trên gà và môi trường ở một số nông hộ tại tỉnh Vĩnh Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ.* 2019; 55(6):1–6.
22. Toro C.S., Salazar J.C., Montero D.A., Ugalde J.A., Díaz J., Cádiz L.A., Henriquez T., García C., Díaz P., Camponovo R., Hermosilla G., Ulloa M.T. Antimicrobial resistance dynamics in Chilean *Shigella sonnei* strains within two decades: role of *Shigella* resistance locus pathogenicity island and class 1 and class 2 integrons. *Front. Microbiol. Sec. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy.* 2022; 12:794470. DOI: 10.3389/fmicb.2021.794470.
23. Shahsavan S., Owlia P., Lari A.R., Bakhshi B., Nobakht M. Investigation of efflux-mediated tetracycline resistance in *Shigella* isolates using the inhibitor and real time polymerase chain reaction method. *Iran. J. Pathol.* 2017; vol. 12(1):53–61.
24. Khaghani S., Shamsizadeh A., Nikfar R., Hesami A. *Shigella flexneri*: a three-year antimicrobial resistance monitoring of isolates in a Children Hospital, Ahvaz, Iran. *Iran. J. Microbiol.* 2023; 6(4):225–9.
25. Velasco V., Mallea A., Bonilla A.M., Campos J., Rojas-García P. Antibiotic-resistance profile of *Staphylococcus aureus* strains in the pork supply chain. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia.* 2022; 38(2):234–40. DOI: 10.29393/CHJAA38-23ARVP50023.

Authors:

Le Thi Lan Anh, Ta Thi Loan, Vu Thi Thuong, Pham Thi Ha Giang, Bui Thi Thanh Nga, Pham Viet Hung, Nguyen Ngoc Tan, Hoang Dang Hieu. Institute of Tropical Medicine, Joint Vietnam-Russia Tropical Science and Technology Research Center. 63, Nguyen Van Huyen Street, Hanoi, Vietnam. E-mail: tropcenterhanoi@mail.com.

Dinh Thu Minh. Hanoi University of Science, Vietnam National University. Hanoi, Vietnam.

Trieu Phi Long. Military Institute of Preventive Medicine. Hanoi, Vietnam.

Le Thi Van Anh. Publishing House for Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology. Hanoi, Vietnam.

Об авторах:

Le Thi Lan Anh, Ta Thi Loan, Vu Thi Thuong, Pham Thi Ha Giang, Bui Thi Thanh Nga, Pham Viet Hung, Nguyen Ngoc Tan, Hoang Dang Hieu. Институт тропической медицины Совместного Вьетнамско-Российского тропического научно-исследовательского и технологического центра. 63, Nguyen Van Huyen Street, Hanoi, Vietnam. E-mail: tropcenterhanoi@mail.com.

Dinh Thu Minh. Ханойский исследовательский университет, Вьетнамский национальный университет. Вьетнам, Ханой.

Trieu Phi Long. Военный институт профилактической медицины. Вьетнам, Ханой.

Le Thi Van Anh. Издательство науки и технологий, Вьетнамская академия наук и технологий. Вьетнам, Ханой.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-91-95

УДК 616.98:579.841.11

Д.Н. Лучинин, Д.В. Устинов, И.М. Шпак, Е.В. Молчанова

Полногеномное секвенирование и поиск детерминант формирования устойчивости к действию бензалкония хлорида у *Burkholderia pseudomallei*

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

Цель исследования – полногеномное секвенирование и сравнительный анализ исходного и резистентного к действию бензалкония хлорида штаммов *Burkholderia pseudomallei*. **Материалы и методы.** В работе использованы штаммы: *B. pseudomallei* 134, *B. pseudomallei* 134K, устойчивый к бензалкония хлориду. Полногеномное секвенирование производили на платформе MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle). Сборку геномов обоих штаммов проводили с помощью ассемблера SPAdes v3.11.1. Для сравнения последовательностей геномов исследуемых штаммов использовали программу Snippy v4.6.0. Для построения выравниваний нуклеотидных и аминокислотных последовательностей применяли программный продукт MEGA X. **Результаты и обсуждение.** Поиск и анализ детерминант, которые могут быть ответственны за появление устойчивости к биоцидам у *B. pseudomallei* 134K, выявили два гена: ген транскрипционного репрессора TetR и ген эффлюксной помпы AmrAB-OprA. В регуляторе TetR обнаружен однонуклеотидный полиморфизм, что обусловило замену серина на пролин в мутантном белке и, как следствие, изменение его вторичной структуры. Предполагается, что данная мутация ведет к потере функции белка-регулятора, в результате чего увеличивается экспрессия регулируемых им генов эффлюксной помпы (AcrB/AcrD/AcrF), в связи с чем происходит как снижение уровня чувствительности к бензалкония хлориду, так и появление резистентности к цефтазидиму. В гене эффлюксной помпы AmrAB-OprA выявлена инсерция 16 нуклеотидов в положении 544-го участка оперона *amrA*, что повлекло за собой увеличение длины цистрона, сдвиг рамки считывания, изменение аминокислотного состава вторичной структуры кодируемого протеина. Вероятнее всего, данная мутация приводит к потере функции оперона *AmrAB-OprA* и невозможности нормального оттока ксенобиотиков из цитоплазмы микроорганизма. Данное предположение подтверждается тем фактом, что мутантный штамм утратил устойчивость к гентамицину.

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, мелиоидоз, устойчивость, дезинфектант, полногеномное секвенирование.

Корреспондирующий автор: Лучинин Дмитрий Николаевич, e-mail: luchinin.dmitrii@yandex.ru.

Для цитирования: Лучинин Д.Н., Устинов Д.В., Шпак И.М., Молчанова Е.В. Полногеномное секвенирование и поиск детерминант формирования устойчивости к действию бензалкония хлорида у *Burkholderia pseudomallei*. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 4:91–95. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-91-95

Поступила 24.08.2023. Отправлена на доработку 31.08.2023. Принята к публ. 11.09.2023.

D.N. Luchinin, D.V. Ustinov, I.M. Shpak, E.V. Molchanova

Whole-Genome Sequencing and Search for Determinants of Resistance to Benzalkonium Chloride in *Burkholderia pseudomallei*

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to carry out whole-genome sequencing and comparative analysis of the original and benzalkonium chloride-resistant strains of *Burkholderia pseudomallei*. **Materials and methods.** We used the strain *B. pseudomallei* 134 and resistant to benzalkonium chloride *B. pseudomallei* 134K. Whole-genome sequencing was conducted on the MiSeq Reagent Kit v3 platform (600-cycle). Genome assembly for both strains was performed with the help of SPAdes v3.11.1. In order to compare genome sequences of the studied strains, Snippy v4.6.0 software was applied. MEGA X program was used to align the nucleotide and amino acid sequences. **Results and discussion.** The search and analysis of determinants responsible for the emergence of resistance to biocides in *B. pseudomallei* 134K have revealed two genes: the TetR transcriptional repressor gene and the AmrAB-OprA efflux pump gene. A single nucleotide polymorphism has been found in the TetR regulator, which led to the replacement of serine by proline in the mutant protein, and, as a result, a change in its secondary structure. It is believed that this mutation causes the loss of regulatory protein functionality, resulting in an increased expression of the efflux pump genes (AcrB/AcrD/AcrF) regulated by it. This follows by both, decrease in the level of sensitivity to benzalkonium chloride and the emergence of resistance to ceftazidime. In the AmrAB-OprA efflux pump gene, an insertion of 16 nucleotides has been detected at the position 544 of the *amrA* operon, which led to an increase in the length of the cistron, a shift in the reading frame, a change in the amino acid composition, and, as a result, a change in the secondary structure of the encoded protein. It is most likely that this mutation contributes to the loss of *AmrAB-OprA* operon function and the failure of normal outflow of xenobiotics from the cytoplasm of the microorganism. This assumption is evidenced by the loss of resistance to gentamicin in the mutant strain.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, melioidosis, resistance, disinfectant, whole-genome sequencing.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Dmitry N. Luchinin, e-mail: luchinin.dmitrii@yandex.ru.

Citation: Luchinin D.N., Ustinov D.V., Shpak I.M., Molchanova E.V. Whole-Genome Sequencing and Search for Determinants of Resistance to Benzalkonium Chloride in *Burkholderia pseudomallei*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2023; 4:91–95. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-91-95

Received 24.08.2023. Revised 31.08.2023. Accepted 11.09.2023.

Luchinin D.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6784-9648>

Ustinov D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4516-731X>

Shpak I.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6446-0274>

Molchanova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3722-8159>

Мелиоидоз – опасное инфекционное заболевание, возбудителем которого является микроорганизм *Burkholderia pseudomallei*. *B. pseudomallei* – представитель микрофлоры почвы и воды открытых водоемов на территориях Северной Австралии, стран Юго-Восточной Азии, Латинской Америки, островов Карибского архипелага [1–3]. Патоген обладает достаточно высоким уровнем резистентности к различным классам антибиотиков, таким как цефалоспорины I и II поколений, пенициллины, аминогликозиды, полимиксины. У *B. pseudomallei* описаны практически все известные механизмы, обуславливающие невосприимчивость к антибактериальным препаратам [4, 5]. Однако на данный момент накоплено мало информации о механизмах формирования устойчивости к дезинфицирующим и антисептическим средствам у возбудителя мелиоидоза и наличии у него генетических детерминант резистентности.

Сейчас на российском рынке представлено более 1300 дезинфекционных композиций, большая часть из которых содержит в своем составе в качестве активного вещества такое четвертично-аммонийное соединение (ЧАС), как алкилдиметилбензиламмония хлорид (бензалкония хлорид, АДБАХ, БХ) [6, 7]. Механизмом действия бензалкония хлорида является разрушение клеточной стенки и, как следствие, высвобождение клеточных компонентов, что в итоге приводит к гибели клетки [8, 9].

Изначально считалось, что формирование у микроорганизмов устойчивости к ЧАС невозможно. Однако начиная с 1950-х гг. неуклонно растет количество сообщений о микроорганизмах, обладающих устойчивостью к четвертично-аммонийным соединениям, в том числе и к АДБАХ [10–12]. В частности, рядом авторов показано, что вследствие нарушения правил дезинфекционной обработки препаратами на основе бензалкония хлорида у микроорганизмов может многократно, до 500 раз, возрастать степень устойчивости к данному дезинфекционному агенту [13, 14].

Ранее установлено, что возбудитель мелиоидоза способен развивать высокую степень устойчивости к БХ, а также показана корреляционная связь между снижением чувствительности *B. pseudomallei* к бензалкония хлориду и появлением резистентности к антибиотикам различных классов [15]. Однако для поиска возможных детерминант, ответственных за устойчивость *B. pseudomallei* к антибактериальным средствам, необходимо провести поиск мутаций, которые способны привести к появлению такой резистентности.

Таким образом, **цель** исследования заключалась в полногеномном секвенировании и сравнительном анализе исходного и резистентного к действию бензалкония хлорида штаммов *B. pseudomallei*.

Материалы и методы

В работе использованы два штамма: исходный *B. pseudomallei* 134 и полученный на его основе мутантный штамм *B. pseudomallei* 134K. *B. pseudomallei* 134K характеризовался повышенной устойчивостью к действию АДБАХ, а также, в отличие от *B. pseudomallei* 134, был резистентен к цефтазидиму, обладал промежуточной устойчивостью к амоксициллину / клавулоновой кислоте, доксициклину и меропенему и чувствительностью к гентамицину. Культуры выращивались на агаре Мюллера – Хинтона (Himedia, Индия) при температуре 37 °C в течение 18–24 часов.

Геномную ДНК исходного штамма *B. pseudomallei* 134 и штамма-селектанта *B. pseudomallei* 134K выделяли при помощи набора Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Life Technologies Inc., США) согласно инструкции производителя. Измерение концентрации ДНК проводили с использованием спектрофотометра Qubit 2.0 (ThermoFisher Scientific, США) и набора для определения концентрации двухцепочечной ДНК Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific, США).

Приготовление библиотеки полногеномного секвенирования выполняли набором Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, США). Мультиплексирование образцов осуществляли набором реагентов Nextera XT Index Kit (Illumina, США). Полногеномное секвенирование производили на платформе MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) в режиме парноконцевого чтения (Illumina, США).

Для анализа качества полученных прочтений применяли программные продукты FASTQC v0.11.9 [16] и MultiQC [17]. Сборку геномов обоих штаммов проводили с помощью ассемблера SPAdes v3.11.1 [18] в режиме анализа парноконцевых прочтений с использованием параметра *careful* для снижения числа мисматчей и коротких делеций. Для сравнения последовательностей геномов штамма *B. pseudomallei* 134 и мутантного штамма *B. pseudomallei* 134K использовали программу для быстрого поиска геномных вариантов и выравнивания ядра генома – Snippy v4.6.0 [19]. Для построения выравниваний нуклеотидных и аминокислотных последовательностей применяли программный продукт MEGA X.

Результаты и обсуждение

В результате секвенирования (таблица) итоговый размер геномов исходного и резистентного к алкилдиметилбензиламмония хлориду штаммов *B. pseudomallei* составил свыше 4 млрд п.о. Количество прочтений с параметром качества выше Q30 превышало 75 %. Геном штамма *B. pseudomallei* 134 был собран из 120 контигов длиной не менее 500 п.н. с суммарной длиной свыше 7 млн п.о. Размер самого протяженного контига (L1) превышал 500 тыс. п.о. Геном штамма, устойчивого к воздействию БХ, собран из 127 контигов расчетной общей длиной более 7 млн п.о. Размер его L1 – больше 400 тыс. п.о.

После сборки полученных геномов двух исследуемых штаммов проведено их сравнение, в результате которого в последовательности резистентного штамма обнаружено 16 мутаций в кодирующей области генома. Поиск и анализ детерминант, которые могут быть ответственны за появление устойчивости к биоцидам у *B. pseudomallei* 134К, определили два гена: ген транскрипционного репрессора TetR с точечной миссенс-мутацией и ген эффлюксной помпы AmrAB-OprA с инсерцией.

TetR – большое семейство транскрипционных регуляторов (TFTR). Изначально считалось, что они осуществляют регуляцию экспрессии генов эффлюкс-насосов. Однако в последнее время представления о TFTR претерпели изменения. Получены данные, что они также регулируют гены, задействованные в клеточном делении и обуславливающие патогенность микроорганизмов [20–22]. Зачастую TFTR располагаются в пределах 200 п.о. от регулируемого гена. У штамма *B. pseudomallei* 134К регулятор транскрипции находился на расстоянии 240 п.о. от генов системы эффлюксной помпы семейства AcrB/AcrD/AcrF. Данный насос обуславливает устойчивость как к антибиотикам (фторхинолоны, цефалоспорины) [23], так и к дезинфекционным и антисептическим соединениям (хлоргексидин, бензалкония хлорид) [24, 25]. Однуклеотидная замена в гене регулятора TetR у устойчивого к АДБАХ штамма привела к замене серина на пролин в мутантном белке, что обусловило изменение его вторичной структуры. Так, произошло сокращение длины α -спирали за счет появления в структуре протеина β -листа (рис. 1). По всей видимости, данная мутация привела к частичной (а возможно, и полной) потере функ-

Характеристика полученных сборок и рядов *B. pseudomallei* 134 и *B. pseudomallei* 134К

Characterization of the assemblies and reads of *B. pseudomallei* 134 and *B. pseudomallei* 134K

Характеристика Characteristics	Штаммы <i>B. pseudomallei</i> Strains of <i>B. pseudomallei</i>	
	<i>B. pseudomallei</i> 134	<i>B. pseudomallei</i> 134K
Объем данных (млрд п.о.) Data volume (billions bp)	2	2,2
Качество Q30 и выше Quality Q30 and more	76,4 %	77,0 %
L1 (п.о.) L1 (bp)	510911	429835
N50 (п.о.) N50 (bp)	182001	222391
Количество контигов (≥ 500 п.о.) Number of contigs (≥ 500 bp)	120	127
Общая длина (≥ 500 п.о.) Total length (≥ 500 bp)	7285364	7287238

ции белка-регулятора, в результате чего увеличилась экспрессия регулируемых генов эффлюксной помпы (AcrB/AcrD/AcrF) и, как следствие, снизился уровень чувствительности к бензалкония хлориду и появилась резистентность к цефтазидиму. Полученные в настоящей работе данные подтверждаются исследованием J.L. Chodkowski и A. Shade, в котором авторы показали, что мутация в гене регулятора TetR привела к повышению уровня устойчивости к антибиотикам у *Burkholderia thailandensis* [26].

Эффлюксная помпа AmrAB-OprA – первая эффлюксная система, описанная у *B. pseudomallei*, относится к суперсемейству RND-транспортеров. Являясь гомологом насоса MexXY-OprM у *Pseudomonas aeruginosa*, определяет устойчивость возбудителя мелиоидоза к аминогликозидам и макролидам [23, 27]. Согласно полученным данным, у *B. pseudomallei* 134К выявлена обширная инсерция в гене эффлюксной помпы AmrAB-OprA. У устойчивого к бензалкония хлориду варианта произошла вставка 16 нуклеотидов в 544-м положении участка оперона *amrA*, что привело к увеличению длины цистрона, сдвигу рамки считывания, изменению аминокислотного состава и вторичной структуры кодируемого протеина (рис. 2). Это, вероятнее всего, привело к потере функции оперона *AmrAB-OprA* и невозможности нормального оттока ксенобиотиков из цитоплазмы микроорганизма. Данная гипотеза

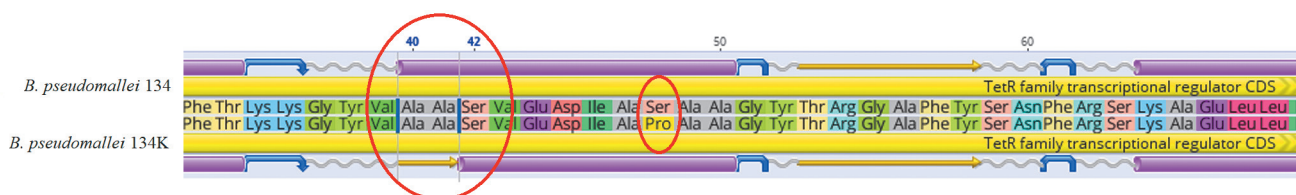


Рис. 1. Мутация и вторичная структура белка транскрипционного репрессора TetR

Fig. 1. Mutation and secondary structure of the transcriptional repressor protein TetR

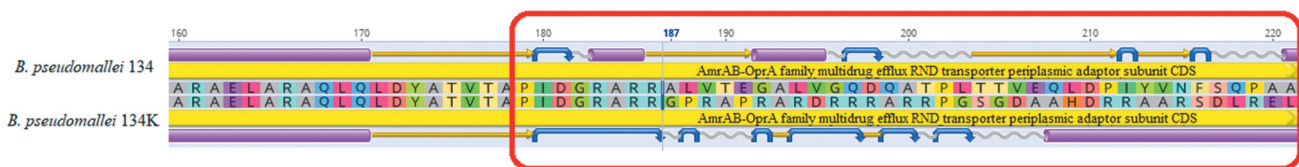


Рис. 2. Мутация и вторичная структура протеина amrA эффлюксной помпы AmrAB-OprA

Fig. 2. Mutation and secondary structure of the amrA protein of the AmrAB-OprA efflux pump

подтверждается тем фактом, что мутантный штамм утратил устойчивость к гентамицину. При анализе литературных данных не удалось найти информацию о том, что эффлюксная система AmrAB-OprA может быть ответственна за устойчивость к каким-либо дезинфектантам. В связи с этим снижение степени чувствительности к АДБАХ из-за мутации в описываемом эффлюксе является маловероятным.

Таким образом, секвенированы исходный штамм *B. pseudomallei* 134 и полученный на его основе штамм *B. pseudomallei* 134К, имеющий повышенный уровень устойчивости к действию бензалкония хлорида. В ходе сравнительного анализа геномов обнаружена мутация в гене транскрипционного репрессора TetR, которая потенциально может быть ответственна за снижение чувствительности возбудителя мелиоидоза к АДБАХ.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

- Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):383–416. DOI: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005.
- 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; 1:15008. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.
- Wiersinga W.J., Virk H.S., Torres A.G., Currie B.J., Peacock S.J., Dance D.A.B., Limmathurotsakul D. Melioidosis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2018; 4:17107. DOI: 10.1038/nrdp.2017.107.
- Schweizer H.P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis. *Future Microbiol.* 2012; 7(12):1389–99. DOI: 10.2217/fmb.12.116.
- 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.
- Национальный справочно-аналитический портал о дезинфекции, зарегистрированных на территории РФ. [Электронный ресурс]. URL: <http://dezreestr.ru/index.html> (дата обращения 03.08.2023).
- Реестр дезсредств. [Электронный ресурс]. URL: <https://dezr.ru/> (дата обращения 05.08.2023).
- de Vries L.E., Christensen H., Skov R.L., Aarestrup F.M., Agersø Y. Diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* and identification of Tn916- and Tn5801-like (Tn6014) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 64(3):490–500. DOI: 10.1093/jac/dkp214.
- Gnanadhas D.P., Marathe S.A., Chakravorty D. Bio-cides – resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2013; 22(2):191–206. DOI: 10.1517/13543784.2013.748035.

- Chaplin C.E. Bacterial resistance to quaternary ammonium disinfectants. *J. Bacteriol.* 1952; 63(4):453–8. DOI: 10.1128/jb.63.4.453-458.1952.

- Merchel Piovesan Pereira B., Tagkopoulou I. Benzalkonium chlorides: uses, regulatory status, and microbial resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(13):e00377-19. DOI: 10.1128/AEM.00377-19.

- Кобзев Е.Н., Чугунов В.А., Родин В.Б., Дегушева Е.В., Слукин П.В., Фёдорова Л.С., Акимкин В.Г. Формирование устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам и пути решения проблемы. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2014; 19(6):48–54.

- Ahn Y., Kim J.M., Lee Y.J., LiPuma J., Hussong D., Marasa B., Cerniglia C. Effects of extended storage of chlorhexidine gluconate and benzalkonium chloride solutions on the viability of *Burkholderia cenocepacia*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 27(12):2211–20. DOI: 10.4014/jmb.1706.06034.

- Kampf G. Adaptive microbial response to low-level benzalkonium chloride exposure. *J. Hosp. Infect.* 2018; 100(3):e1–e22. DOI: 10.1016/j.jhin.2018.05.019.

- 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; 3:115–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-115-119.

- Babraham Bioinformatics – Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

- Ewels P., Magnusson M., Lundin S., Källér M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics.* 2016; 32(19):3047–8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw354.

- 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.

- Snippy. [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/tseemann/snippy> (дата обращения 10.07.2023).

- Cuthbertson L., Nodwell J.R. The TetR family of regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013; 77(3):440–75. DOI: 10.1128/MMBR.00018-13.

- Ramos J.L., Martínez-Bueno M., Molina-Henares A.J., Terán W., Watanabe K., Zhang X., Gallegos M.T., Brennan R., Tobes R. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005; 69(2):326–56. DOI: 10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005.

- Colclough A.L., Scadden J., Blair J.M.A. TetR-family transcription factors in Gram-negative bacteria: conservation, variation and implications for efflux-mediated antimicrobial resistance. *BMC Genomics.* 2019; 20(1):731. DOI: 10.1186/s12864-019-6075-5.

- 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):103–10. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70025-7.

- Maseda H., Hashida Y., Konaka R., Shirai A., Kourai H. Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetylpyridinium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(12):5230–5. DOI: 10.1128/AAC.00631-09.

- Begic S., Worobec E.A. The role of the *Serratia marcescens* SdeAB multidrug efflux pump and TolC homologue in fluoroquinolone resistance studied via gene-knockout mutagenesis. *Microbiology (Reading).* 2008; 154(Pt. 2):454–61. DOI: 10.1099/mic.0.2007/012427-0. Erratum in: *Microbiology.* 2009; 155(Pt. 6):2109–11.

26. Chodkowski J.L., Shade A. A coevolution experiment between *Flavobacterium johnsoniae* and *Burkholderia thailandensis* reveals parallel mutations that reduce antibiotic susceptibility. *Microbiology (Reading)*. 2023; 169(2):001267. DOI: 10.1099/mic.0.001267.

27. 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.

References

- Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):383–416. DOI: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005.
- 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; 1:15008. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.
- Wiersinga W.J., Virk H.S., Torres A.G., Currie B.J., Peacock S.J., Dance D.A.B., Limmathurotsakul D. Melioidosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2018; 4:17107. DOI: 10.1038/nrdp.2017.107.
- Schweizer H.P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis. *Future Microbiol.* 2012; 7(12):1389–99. DOI: 10.2217/fmb.12.116.
- Zakharova I.B., Toporkov A.V., Viktorov D.V. [Melioidosis in aspects of epidemiology, clinical presentation and laboratory diagnostics]. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2021; 11(3):409–22. DOI: 10.15789/2220-7619-MIA-1584.
- [National reference and analytical portal about disinfectants registered on the territory of the Russian Federation]. (Cited 08 Mar 2023). [Internet]. Available from: <http://dezrestr.ru/index.html>.
- [Register of disinfectants]. (Cited 08 May 2023). [Internet]. Available from: <https://dezr.ru/>.
- de Vries L.E., Christensen H., Skov R.L., Aarestrup F.M., Agersø Y. Diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* and identification of Tn916- and Tn5801-like (Tn6014) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 64(3):490–500. DOI: 10.1093/jac/dkp214.
- Gnanadhas D.P., Marathe S.A., Chakravorty D. Biocides – resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2013; 22(2):191–206. DOI: 10.1517/13543784.2013.748035.
- Chaplin C.E. Bacterial resistance to quaternary ammonium disinfectants. *J. Bacteriol.* 1952; 63(4):453–8. DOI: 10.1128/jb.63.4.453-458.1952.
- Merchel Piovesan Pereira B., Tagkopoulos I. Benzalkonium chlorides: uses, regulatory status, and microbial resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(13):e00377-19. DOI: 10.1128/AEM.00377-19.
- Kobzev E.N., Chugunov V.A., Rodin V.B., Detusheva E.V., Slukin P.V., Fedorova L.S., Akimkin V.G. [Formation of resistance to disinfectants in microorganisms and ways to solve the problem]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2014; 19(6):48–54.
- Ahn Y., Kim J.M., Lee Y.J., LiPuma J., Hussong D., Marasa B., Cerniglia C. Effects of extended storage of chlorhexidine gluconate and benzalkonium chloride solutions on the viability of *Burkholderia cenocepacia*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 27(12):2211–20. DOI: 10.4014/jmb.1706.06034.
- Kampf G. Adaptive microbial response to low-level benzalkonium chloride exposure. *J. Hosp. Infect.* 2018; 100(3):e1–e22. DOI: 10.1016/j.jhin.2018.05.019.
- 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):115–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-115-119.

16. Babraham Bioinformatics – Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. [Internet]. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

17. Ewels P., Magnusson M., Lundin S., Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016; 32(19):3047–8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw354.

18. 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.

19. Snippy. (Cited 10 Jul 2023). [Internet]. Available from: <https://github.com/tseemann/snippy>.

20. Cuthbertson L., Nodwell J.R. The TetR family of regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013; 77(3):440–75. DOI: 10.1128/MMBR.00018-13.

21. Ramos J.L., Martínez-Bueno M., Molina-Henares A.J., Terán W., Watanabe K., Zhang X., Gallegos M.T., Brennan R., Tobes R. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005; 69(2):326–56. DOI: 10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005.

22. Colclough A.L., Scadden J., Blair J.M.A. TetR-family transcription factors in Gram-negative bacteria: conservation, variation and implications for efflux-mediated antimicrobial resistance. *BMC Genomics*. 2019; 20(1):731. DOI: 10.1186/s12864-019-6075-5.

23. 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):103–10. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70025-7.

24. Maseda H., Hashida Y., Konaka R., Shirai A., Kourai H. Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetylpyridinium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(12):5230–5. DOI: 10.1128/AAC.00631-09.

25. Begic S., Worobec E.A. The role of the *Serratia marcescens* SdeAB multidrug efflux pump and TolC homologue in fluoroquinolone resistance studied via gene-knockout mutagenesis. *Microbiology (Reading)*. 2008; 154(Pt. 2):454–61. DOI: 10.1099/mic.0.2007/012427-0. Erratum in: *Microbiology*. 2009; 155(Pt. 6):2109–11.

26. Chodkowski J.L., Shade A. A coevolution experiment between *Flavobacterium johnsoniae* and *Burkholderia thailandensis* reveals parallel mutations that reduce antibiotic susceptibility. *Microbiology (Reading)*. 2023; 169(2):001267. DOI: 10.1099/mic.0.001267.

27. 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.

Authors:

Luchinin D.N., Ustinov D.V., Shpak I.M., Molchanova E.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., Устинов Д.В., Шпак И.М., Молчанова Е.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-96-105

УДК 616.98:579.842.23

М.А. Макашова, Л.М. Куклева, Н.С. Червякова, Е.А. Нарышкина, А.В. Коврижников,
Г.А. Ерошенко, И.Г. Швиденко, В.В. Кутырев

Ауксотрофность штаммов *Yersinia pestis* античного биовара и ее генетические основы

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

Цель – изучение зависимости роста от аминокислот у штаммов *Yersinia pestis* разных филогенетических ветвей античного биовара и определение генетических основ ауксотрофности этих штаммов. **Материалы и методы.** В работе использовали 38 штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара, выделенных в различных очагах мира в период 1928–2020 гг. Питательные потребности штаммов определяли высевом на минимальный агар Difco с различным набором аминокислот. Для проведения филогенетического анализа штаммов использовали программы Wombac 2.0 и SeaView 5.0.5. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов выполняли с помощью алгоритма BLAST и программы Mega 7.0. **Результаты и обсуждение.** Определена филогенетическая принадлежность использованных штаммов *Y. pestis* античного биовара к филогенетическим ветвям 0.ANT3, 0.ANT5, 1.ANT, 2.ANT3, 3.ANT2, 4.ANT. Установлено, что у всех исследованных штаммов античного биовара имеется общая зависимость роста от трех аминокислот – фенилаланина, треонина и метионина. У большинства штаммов античного биовара всех филогенетических ветвей рост также зависел от присутствия в среде цистеина, за исключением части штаммов филогенетической ветви 4.ANT. В 14 генах метаболизма серы и цистеина обнаружено 19 мутаций. Для каждой филогенетической группы античного биовара характерен свой профиль мутаций в генах, участвующих в биосинтезе цистеина. Установлена потребность в лейцине штаммов филогенетической ветви 0.ANT5, причиной которой может являться сдвиг рамки считывания в гене *leuA*. Штаммы ветви 1.ANT, выделенные на территории Демократической Республики Конго, проявляли дополнительную зависимость роста от пролина. Установленные питательные потребности штаммов и генетические причины ауксотрофности дополняют фенотипические и генетические характеристики филогенетических ветвей античного биовара и могут быть использованы в качестве генетических маркеров для дифференциации этих штаммов.

Ключевые слова: возбудитель чумы, античный биовар, питательные потребности штаммов.

Корреспондирующий автор: Макашова Марина Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Макашова М.А., Куклева Л.М., Червякова Н.С., Нарышкина Е.А., Коврижников А.В., Ерошенко Г.А., Швиденко И.Г., Кутырев В.В. Ауксотрофность штаммов *Yersinia pestis* античного биовара и ее генетические основы. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 4:96–105. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-96-105

Поступила 22.09.2023. Принята к публ. 30.10.2023.

M.A. Makashova, L.M. Kukleva, N.S. Chervyakova, E.A. Naryshkina, A.V. Kovrizhnikov,
G.A. Eroshenko, I.G. Shvidenko, V.V. Kutyrev

Auxotrophy of *Yersinia pestis* Strains of Antiqua Biovar and Its Genetic Basis

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

Abstract. The aim of the work was to study the growth dependence on amino acids in *Yersinia pestis* strains of different phylogenetic branches of the antiqua biovar and to determine the genetic basis of auxotrophy of these strains. **Materials and methods.** We used 38 strains of *Y. pestis*, the main subspecies of the antiqua biovar, isolated in various foci of the world in the period of 1928–2020. The nutritional requirements of the strains were determined by incubation on Difco minimal agar with different sets of amino acids. Phylogenetic analysis of the strains was carried out using the Wombac 2.0 and SeaView 5.0.5 programs. Comparative analysis of the nucleotide sequences of the genes was performed using the BLAST algorithm and the Mega 7.0 program. **Results and discussion.** The phylogenetic appurtenance of the investigated *Y. pestis* strains of antiqua biovar to the phylogenetic branches 0.ANT3, 0.ANT5, 1.ANT, 2.ANT3, 3.ANT2, 4.ANT has been determined. It is established that all studied strains have a common dependence of growth on three amino acids – phenylalanine, threonine, and methionine. In the majority of the strains of antiqua biovar of all phylogenetic branches, growth is also dependent on the presence of cysteine in the medium, except for a part of the strains of the phylogenetic branch 4.ANT. In 14 genes of sulfur and cysteine metabolism, 19 mutations have been identified. Each phylogenetic group of the antique biovar has a distinct profile of mutations in genes involved in cysteine biosynthesis. The leucine requirement of the strains belonging to phylogenetic branch 0.ANT5 has been established, possibly caused by a frame shift in the *leuA* gene. Strains of the 1.ANT branch isolated in the Democratic Republic of the Congo demonstrate an additional proline-dependent growth. The defined nutritional requirements in the strains and the genetic causes of auxotrophy complement the phenotypic and genetic characteristics of the phylogenetic branches of the antiqua biovar and can be used as genetic markers for the differentiation of these strains.

Key words: plague agent, antiqua biovar, and nutritional requirements of strains.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Marina A. Makashova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Makashova M.A., Kukleva L.M., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Kovrizhnikov A.V., Eroshenko G.A., Shvidenko I.G., Kutuyev V.V. Auxotrophy of *Yersinia pestis* Strains of Antiqua Biovar and Its Genetic Basis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2023; 4:96–105. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-96-105

Received 22.09.2023. Accepted 30.10.2023.

Makashova M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7713-7959>

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

Chervyakova N.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3133-3820>

Naryshkina E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>

Kovrizhnikov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7752-6321>

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

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

Античный биовар основного подвида возбудителя чумы *Yersinia pestis* состоит из штаммов с высокой вирулентностью и эпидемической значимостью и делится на ряд филогенетических ветвей, обозначаемых 1.ANT – 4.ANT, происходящих от наиболее ранней ветви античного биовара 0.ANT. В свою очередь от двух ветвей античного биовара произошли три других биовара основного подвида: от 1.ANT – биовары 1.INT (интермедиум) и 1.ORI (восточный), от 2.ANT – 2.MED (средневековый). По данным палеогеномных исследований установлено, что этиологические агенты первых двух пандемий относились к штаммам античного биовара [1–4]. В настоящее время штаммы античного биовара распространены в очагах Центральной и Восточной Азии, Африки (Россия, Кыргызстан, Казахстан, Монголия, Китай, Демократическая Республика Конго [ДРК], Уганда, Замбия). Они вызывают на этих территориях эпизоотии, вспышки и единичные случаи заболеваний людей чумой [5].

Длительное существование штаммов *Y. pestis* античного биовара в различных ландшафтно-географических зонах, многообразие их носителей и переносчиков привело к разнообразию питательных потребностей штаммов. Ранее установлено, что все штаммы основного подвида являются ауксотрофами по фенилаланину, метионину и треонину, в то время как для ряда штаммов требуются дополнительные факторы роста [6]. Ранее анализ питательных потребностей штаммов античного биовара проводился по их географической и очаговой принадлежности либо для ограниченного количества филогенетических групп, в то время как для понимания направлений микроэволюции античного биовара и его более полной характеристики важно получение данных по различным филогенетическим ветвям. Опубликован ряд работ, связывающих утрату способности к некоторым метаболическим реакциям с вирулентностью основного подвида *Y. pestis* [7]. Кроме того, выявленные мутации в генах метаболизма аминокислот могут быть использованы в качестве генетических маркеров для дифференциации штаммов возбудителя чумы разного происхождения. **Целью** настоящей работы является изучение зависимости роста от аминокислот штаммов *Y. pestis* разных филогенетических ветвей античного биовара и определение генетических основ ауксотрофности этих штаммов.

Материалы и методы

Штаммы *Y. pestis* и условия культивирования. В работе использовали 38 штаммов *Y. pestis*,

выделенных в различных географических регионах мира в период 1928–2020 гг. Штаммы выращивали на агаровой среде LB (pH 7,2) при температуре 28 °C в течение 48 ч. Биохимические свойства штаммов изучали с помощью набора API 20 E (Bio-Mérieux, Франция). Питательные потребности штаммов определяли по методу Brubaker с модификациями в нескольких биологических повторах [6, 8]. Для этого штаммы культивировали на минимальном 1,5 % агаре типа Difco (pH 7,2) с различной комбинацией аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан, метионин, цистеин, треонин, серин, глицин, лейцин, валин, изолейцин, аланин, пролин, аргинин, глютаминовая кислота, аспарагиновая кислота, лизин, гистидин, аденин) при 28 °C в течение 48 ч. В качестве контрольного использовали прототрофный штамм *Y. pseudotuberculosis* 68. Выделение ДНК осуществляли набором реагентов PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США).

Высокопроизводительное секвенирование, филогенетическое исследование, сравнительный анализ генов метаболизма *Y. pestis*. Определение полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pestis* проводили в системе Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, США). Обработку полученных данных выполняли программами Ion Torrent Suite software package 5.12 и Newbler gsAssembler 2.6. Поиск коровых единичных нуклеотидных полиморфизмов SNPs (от англ. single nucleotide polymorphism) в геномах *Y. pestis* проводили в программе Wombac 2.0. Дендрограмму строили на основе 1756 выявленных коровых SNPs после удаления участков гомоплазии в программе SeaView 5.0.5 по алгоритму Maximum Likelihood (модель HKY85) с использованием 1000 бутстреп-реплик. Для анализа метаболических путей различных питательных субстратов использовали базу данных KEGG [9]. В качестве референсных взяты геномы *Y. pestis* CO92 (номер доступа GenBank: GCA_000009065.1) и *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 (серотип I) (номер доступа GenBank: GCA_000047365.1). Гены биосинтеза аминокислот анализировали при использовании алгоритма BLAST и программы Mega 7.0.

Результаты и обсуждение

Свойства и филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* античного биовара. При изучении биохимических свойств все штаммы проявляли характерные для античного биовара особенности, а именно ферментировали глицерин, арабинозу, но не были способны утилизировать рамнозу. У всех исследован-

ных штаммов выявлена активность β -галактозидазы (ортонитрофенил- β D-галактопиранозидаса), у штамма *Y. pestis* 236 (22) – способность к окислению амигдалина. Все штаммы обладали денитрифицирующей способностью, за исключением штамма *Y. pestis* 235 (21), что совпадало с ранее опубликованными данными [10]. При сравнении генов периплазматической нитратредуктазы *narABCDF* у штаммов античного биовара отличий в нуклеотидных последовательностях этого штамма не выявлено.

Проведенный анализ данных высокопроизводительного секвенирования ДНК всех 38 взятых в исследование штаммов *Y. pestis* античного биовара позволил установить их филогенетическую принад-

лежность к ветвям 0.ANT3, 0.ANT5, 1.ANT, 2.ANT3, 3.ANT2, 4.ANT на основании кластеризации со штаммами с известной филогенетической принадлежностью, опубликованными в NCBI GenBank (рис. 1). Согласно дендрограмме штаммы линии 0 отходят от древнего ствола эволюции, в то время как ветви 1, 2, 3 и 4 отделяются от ветви 0.ANT в точке политомии центрального узла, что согласуется с ранее опубликованными данными [11, 12].

Питательные потребности штаммов *Y. pestis* античного биовара. При изучении питательных потребностей установлено, что все штаммы *Y. pestis* античного биовара по своим питательным потребностям разделяются на четыре группы. Для первой

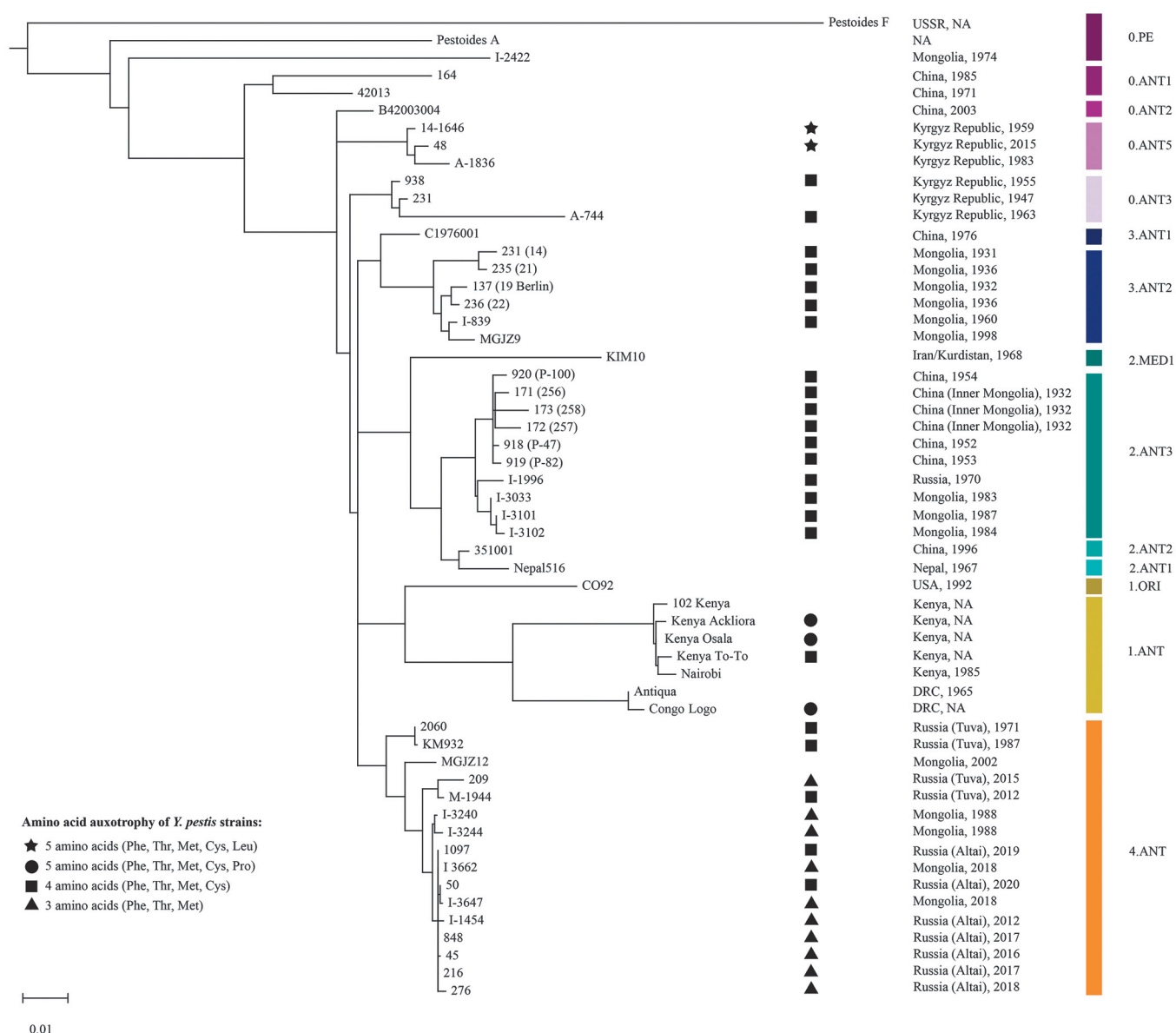


Рис. 1. Филогенетический анализ и питательные потребности штаммов *Y. pestis* античного биовара. Анализ выполнен с использованием программ Wombac 2.0, SeaView 5.0.5 (алгоритм Maximum Likelihood, модель HKY85, 1000 бутстреп-реплик). Геномы штаммов с неуказанными питательными потребностями взяты из базы данных NCBI GenBank. Для укоренения использовали штамм наиболее древнего тибетского подвида *Y. pestis* 620024 (выделен в Китае в 1962 г.) филогенетической ветви 0.PE7 (не указан на рисунке)

Fig. 1. Phylogenetic analysis and nutritional requirements of *Y. pestis* strains of the antiqua biovar. The analysis was performed using Wombac 2.0, SeaView 5.0.5 software (Maximum Likelihood algorithm, model HKY85, 1000 bootstrap replicas). Genomes of the strains with unspecified nutritional requirements were obtained from the NCBI GenBank database. For rooting, we used the strain of the most ancient Tibetan subspecies *Y. pestis* 620024 (isolated in China in 1962) of the phylogenetic branch 0.PE7 (not shown in the figure)

группы штаммов характерной особенностью является ауксотрофность по пяти аминокислотам: фенилаланину, метионину, треонину, цистеину и лейцину. К этой группе относятся штаммы древней эволюционной ветви 0.ANT5, филогенетически близкие к штаммам Юстиниановой чумы, циркулирующие в эпизоотически активных в настоящий момент очагах чумы Кыргызстана [13].

Ко второй группе можно отнести выделенные на территории ДРК и Кении штаммы филогенетической ветви 1.ANT, которые нуждаются в фенилаланине, метионине, треонине, цистеине и пролине. Следует отметить, что эти штаммы растут лучше при добавлении в среду лейцина.

Следующей группе штаммов для роста требовалось присутствие в питательной среде фенилаланина, метионина, треонина, цистеина. Выявлено, что ауксотрофность по этим четырем аминокислотам встречается у штаммов *Y. pestis* большинства филогенетических ветвей античного биовара, а именно: 0.ANT3 из очагов чумы Кыргызстана; 2.ANT3 из Китая и Монголии; уникальной для Монголии филогенетической ветви 3.ANT2; а также у пяти штаммов филогенетической ветви 4.ANT из республик Тыва (2060, KM932, M-1944) и Алтай (1097, 50) Российской Федерации. Кроме того, штамм Kenya To-To, выделенный в Кении, вместе со штаммом Nairobi образующий отдельный от других штаммов филогенетической ветви 1.ANT кластер, для полноценного роста также нуждался в четырех аминокислотах.

В четвертую группу вошли штаммы филогенетической ветви 4.ANT из Горно-Алтайского и Сайлюгемского высокогорных и Тувинского горного очагов чумы (Россия, Монголия), нуждающиеся для своего роста в трех аминокислотах: фенилаланине, метионине, треонине. Примечательно, что у популяции 4.ANT из Монголии зависимости роста от цистеина, характерной для части штаммов из Горно-Алтайского и Тувинского очагов, не наблюдается.

Генетические причины ауксотрофности штаммов *Y. pestis* античного биовара. Известно, что для всех штаммов возбудителя чумы основного подвида универсальной является зависимость роста от присутствия в среде трех аминокислот: фенилаланина, метионина и треонина [6]. В связи с этим в целях поиска общих генетических причин ауксотрофности по трем аминокислотам нами проведено сравнение последовательности генов референсного штамма *Y. pestis* CO92 с таковыми у эволюционного предка возбудителя чумы *Y. pseudotuberculosis*, референсный штамм IP 32953, в то время как для установления причин зависимости роста от дополнительных аминокислот проводили сравнение последовательностей генов между штаммами *Y. pestis* античного биовара.

Ранее установлено, что ауксотрофность возбудителя чумы по фенилаланину может быть связана с внедрением IS-элемента в ген *pheA*, кодирую-

щий бифункциональный фермент хоризматмутазу-префенатдегидратазу [14]. Нами при анализе геномов штаммов возбудителя чумы античного биовара установлено, что в филогенетических ветвях 0.ANT1 и 2.ANT1 эта мутация отсутствует (таблица). Информация о питательных потребностях этих групп штаммов могла бы прояснить роль этого генетического изменения для ауксотрофности *Y. pestis*, однако таких штаммов в нашем распоряжении не было и эти данные в литературных источниках отсутствуют.

При анализе генов *tyrA*, *tyrB*, *YPO1353*, *YPO3343*, продукты которых также участвуют в биосинтезе фенилаланина, нами выявлен ряд несинонимичных SNPs (от англ. non-synonymous SNP, nsSNP) у всех штаммов возбудителя чумы в гене *tyrB* аминотрансферазы ароматических аминокислот (1080–1081-я позиции гена, AspArg→GluSer) и в гене циклогексадиенилдегидратазы *YPO3343* (G→A, 544-я позиция гена, Asp→Asn). Влияние описанных мутаций, приводящих к смене аминокислотных остатков, на ауксотрофность штаммов античного биовара по фенилаланину предстоит выяснить в дальнейшем.

Основной причиной ауксотрофности штаммов *Y. pestis* основного подвида по метионину является мутация в гене цистатионин-γ-синтазы *metB* (в позиции 988 отсутствие гуанина), в результате которой происходит сдвиг рамки считывания [14, 15]. По проведенным нами исследованиям эта мутация присутствует у всех ветвей античного биовара, что подтверждает ее влияние на зависимость роста штаммов основного подвида (и античного биовара в частности) от метионина. Нами также проведено сравнение других генов биосинтеза метионина: *metA*, *metC*, *metH*. В гене *metH* кроме nsSNP (C→T, 620-я позиция гена, Ala→Val) присутствует гетерогенная область, содержащая повтор длиной в 74 п.н., характерный для штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 4.ANT из Горно-Алтайского высокогорного и Сайлюгемского природных очагов.

В синтезе метионина у *Y. pseudotuberculosis* участвуют ферменты оперона *mtnKADCB*, использующие S-метил-5-тиоаденозин в качестве субстрата в пути утилизации метионина. Ранее установлено, что у штамма *Y. pestis* CO92 отсутствует этот путь, сохранившийся только у штаммов Pestoides F и Angola [16]. При сравнении последовательностей генов у штаммов, депонированных в базе данных NCBI GenBank, нами установлено, что эта область сохранилась только у штаммов кавказского, улегейского и ангольского подвигов. Вероятно, утрата этого региона произошла в результате деятельности фагов или мобильных генетических элементов. Бесконечное накопление S-метил-5-тиоаденозина без утилизации является термодинамически невозможным, в связи с чем предполагается присутствие в геноме *Y. pestis* других генов, продукты которых участвуют в утилизации этого субстрата [16].

Мутации в генах биосинтеза аминокислот у штаммов *Y. pestis* античного биовара разных филогенетических ветвей
Mutations in the genes involved in the biosynthesis of amino acids in *Y. pestis* strains of antiqua biovar of different phylogenetic branches

Ген Gene	Кодируемый продукт Encoded product	Мутация (позиция от начала гена)* Mutation (position from the beginning of the gene)*	Филогенетическая ветвь, штаммы Phylogenetic branch, strains
Phenylalanine			
<i>pheA</i> YPO3281	chorismate mutase and prephenate dehydratase	IS100	All <i>Y. pestis</i> strains (except for 0.ANT1, 2.ANT1)
Treonine			
<i>ltaA</i> YPO1357	threonine aldolase	C→A (680) Gly→Asp	2.ANT2 (China)
Methionine			
<i>metH</i> YPO3722	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	Insertion of 74 bp (2937–3010)	4.ANT (Mongolia, Russia [Altai])
<i>metC</i> YPO0278	cysteine-S-conjugate β-lyase	C→T (467) Pro→Leu	1.ANT (Kenya)
<i>metC</i> YPO3006	cysteine-S-conjugate β-lyase	G→C (1139) Ser→Thr	2.ANT
<i>mtn</i> YPO3384	adenosylhomocysteine nucleosidase	G→A (475) Ala→Thr	1.ANT (DRC)
Cysteine and sulfur metabolism			
<i>cysM</i> YPO3011	S-sulfo-L-cysteine synthase (O-acetyl-L-serine-dependent)	Deletion of 52 bp (734–785)	4.ANT (Mongolia, Russia [Altai and <i>Y. pestis</i> M-1944, 209 from Tuva])
<i>ssiA</i> YPO0182	taurine transport system substrate-binding protein	Deletion of 3 bp (547–549)	0.ANT3, 1.ANT
		Deletion of 91 bp (616–705)	1.ANT (Kenya)
		Deletion of 18 bp (1042–1059)	1.ANT (DRC)
<i>ssuA</i> YPO3624	sulfonate transport system substrate-binding protein	Insertion of 30 bp	0.ANT1 – 2.ANT2 3.ANT1, 3.ANT2, 4.ANT (<i>Y. pestis</i> 2060, KM932 from Tuva)
		Insertion of 15 bp	2.ANT3, 4.ANT (Mongolia, Russia [Altai and <i>Y. pestis</i> M-1944, 209 from Tuva])
<i>cysJ</i> YPO3372	sulfite reductase (NADPH) flavoprotein α-component	Deletion of 36 bp (655–690)	Branch 1 (1.ANT, 1.ORI, 1.INT)
		Deletion of 18 bp (673–690)	0.ANT1 – 0.ANT5 2.ANT1 – 4.ANT
		G→T (369) Glu→Asp	3.ANT2
<i>YPO4110</i>	ABC transporter permease polar amino acid transport system permease protein ABC	A→T (638) Gln→Leu	2.ANT3 (Inner Mongolia)
<i>YPO1319</i>	putative ABC transport integral membrane subunit D-methionine transport system permease protein	T→C (35) Val→Ala	4.ANT (<i>Y. pestis</i> 2060, KM932 from Tuva)
<i>YPO4111</i>	putative periplasmic solute-binding protein polar amino acid transport system substrate-binding protein	Deletion of 93 bp (1–93)	1.ANT
<i>ssuD</i> YPO3625	alkanesulfonate monooxygenase	Deletion of 5 bp (901–905)	0.ANT2
<i>dmsA</i> YPO2965	anaerobic dimethyl sulfoxide reductase subunit A	G→T (1172) Arg→Leu	2.ANT
<i>sbp1</i> YPO0079	sulfate/thiosulfate transport system substrate-binding protein	G→A (88) Asp→Asn	3.ANT2 (<i>Y. pestis</i> 137 [19] Berlin, 236 [22])
Leucine			
<i>leuA</i> YPO0533	2-isopropylmalate synthase	Deletion of 11 bp (1409–1419)	0.ANT5
<i>leuB</i> YPO0532	3-isopropylmalate dehydrogenase	G→A (98) Arg→His	4.ANT (Mongolia, Russia [Altai and <i>Y. pestis</i> M-1944, 209 from Tuva])
<i>leuD</i> YPO0530	3-isopropylmalate dehydratase small subunit 3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydratase small subunit	G→A (157) Gly→Ser	1.ANT
Proline			
<i>poaA</i> YPO1851	RHH-type transcriptional regulator, proline utilization regulon repressor/proline dehydrogenase/δ-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	G→A (8) Ser→Asn	1.ANT
<i>proB</i> YPO3222	glutamate 5-kinase	C→T (149) Ser→Phe	1.ANT (DRC)
		IS100	1.ANT (<i>Y. pestis</i> Nairobi)
<i>pip</i> YPO1781	proline iminopeptidase	IS100	1.ANT (<i>Y. pestis</i> Antiqua)

Примечание: * Сравнение проводилось с последовательностью *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 (серотип I) (номер доступа GenBank: GCA_000047365.1).

Note: * The comparison was performed against the sequence of *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 (serotype I) (GenBank access No. GCA_000047365.1).

В генах биосинтеза треонина *ltaA*, *metL*, *asd*, *thrABC* нами не найдено мутаций, однозначно приводящих к нарушению признака, однако зависимость роста от присутствия в среде треонина универсальна для всех штаммов основного подвида. Предполагается, что это явление связано с недостаточным поступлением азота, в результате чего этот элемент поглощается клеткой через менее эффективные многоступенчатые пути преобразования других аминокислот, что приводит к снижению скорости роста [16]. При сравнении геномов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* в гене *apk* лизин-чувствительной аспартокиназы III нами выявлен один nsSNP (A→T, 234-я позиция гена, Glu→Asp).

При сравнении гена *cysH* фосфоаденилсульфат-редуктазы, участвующей в пути синтеза цистеина, у штамма *Y. pestis* CO92 выявлена делеция восьми пар нуклеотидов (463–470-я позиции гена) [14], присутствующая у всех штаммов *Y. pestis*. Однако штаммы *Y. pestis* части филогенетических ветвей не зависят от цистеина, в том числе и ряд штаммов филогенетической ветви 4.ANT, что ставит под сомнение влияние этой мутации на аукоотрофность *Y. pestis*. Известно, что синтез цистеина также связан с обменом серы и метионина, в связи с чем для установления причин зависимости роста от присутствия в среде цистеина нами проведен анализ 59 генов синтеза цистеина и метаболизма серы (таблица, рис. 2).

В результате сравнения генов штаммов *Y. pestis* разных филогенетических ветвей античного биовара в 14 генах, участвующих в биосинтезе цистеина, нами выявлено 19 мутаций различного типа (таблица). Для каждой филогенетической ветви характерен уникальный набор мутаций: 0.ANT2 (инсерция 30 п.н. *ssuA*, nsSNP *ssuD*, делеция 18 п.н. *cysJ*), 0.ANT3 (инсерция 30 п.н. *ssuA*, делеция 3 п.н. *ssiA*, делеция 18 п.н. *cysJ*), 0.ANT5 (инсерция 30 п.н. *ssuA*, делеция 18 п.н. *cysJ*), 1.ANT штаммы из Кении (инсерция 30 п.н. *ssuA*, делеции 3 п.н. и 91 п.н. *ssiA*, делеция 36 п.н. *cysJ*, nsSNP *YPO4111*, nsSNP *YPO0278*), 1.ANT штаммы из ДПК (инсерция 30 п.н. *ssuA*, делеции 3 п.н. и 18 п.н. *ssiA*, делеция 36 п.н. *cysJ*, nsSNP *mtn*, nsSNP *YPO4111*), 2.ANT1 и 2.ANT2 (инсерция 30 п.н. *ssuA*, nsSNP *YPO3006*, nsSNP *dmsA*, делеция 18 п.н. *cysJ*), 2.ANT3 (инсерция 15 п.н. *ssuA*, nsSNP *YPO3006*, nsSNP *dmsA*, nsSNP *YPO4110*, делеция 18 п.н. *cysJ*), 3.ANT2 (инсерция 30 п.н. *ssuA*, nsSNP *spb1*, делеция 18 п.н. *cysJ*), 4.ANT (инсерция 30 п.н./15 п.н. *ssuA*, делеция *cysM*, nsSNP *YPO1319*, инсерция *metH*, делеция 18 п.н. *cysJ*). Таким образом, для всех штаммов *Y. pestis* античного биовара, помимо нарушения гена *cysH* (делеция 8 п.н.), общими генами с нарушенной структурой являются *ssuA* (инсерция 30 п.н./15 п.н.) и *cysJ* (делеция 36 п.н./18 п.н.). Возможно, нарушение этих генов привело к отсутствию селективного давления на сохранение целостности других генов метаболических путей цистеина,

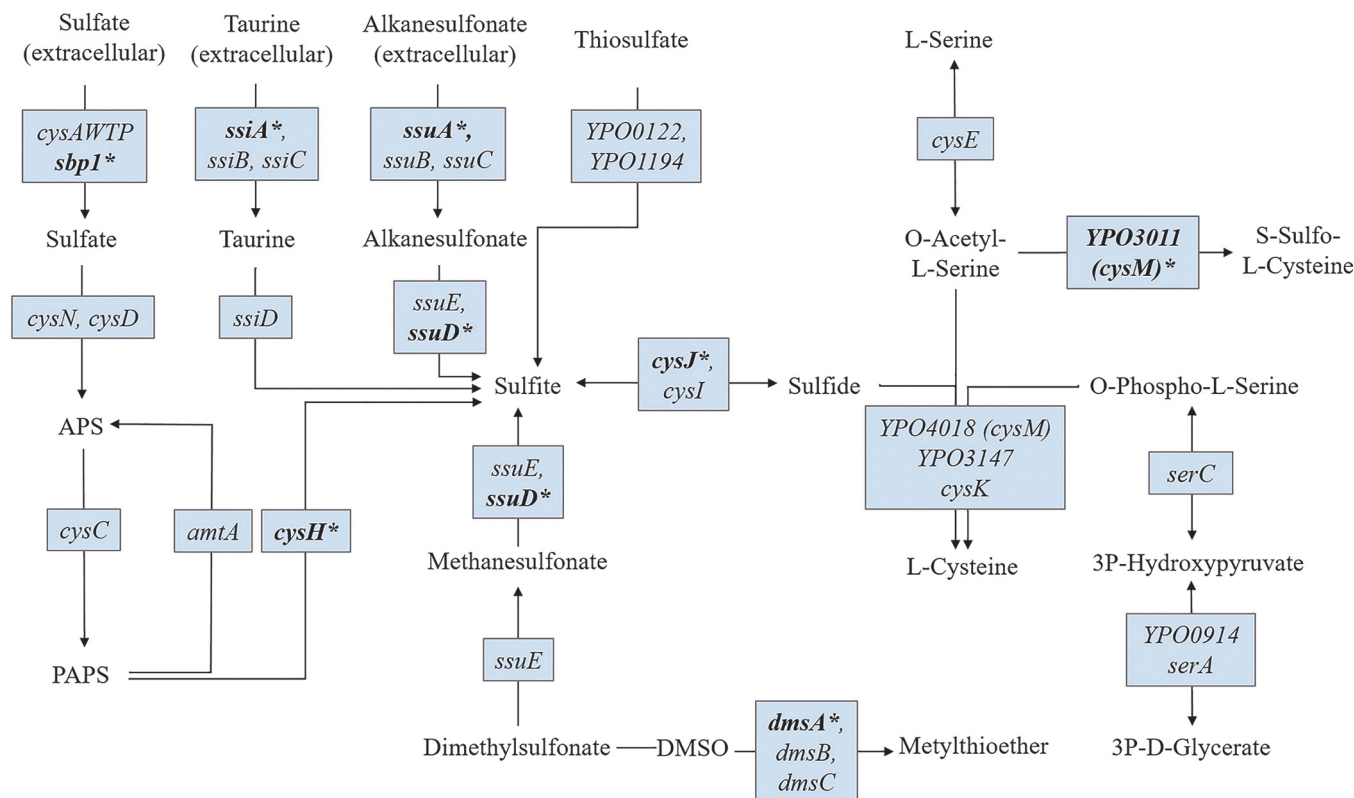


Рис. 2. Метаболический путь биосинтеза цистеина и обмена серы у штаммов *Y. pestis* античного биовара. Полужирным шрифтом выделены гены, содержащие мутации

Fig. 2. Metabolic pathway of cysteine biosynthesis and sulfur metabolism in *Y. pestis* strains of antiqua biovar. Genes containing mutations are highlighted in bold

метионина и обмена серы. Нарушения генов *ssuA* и *cysJ* у штаммов *Y. pestis* KIM10+ и *Y. pestis* CO92 выявлены ранее в результате сравнения с последовательностями *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 [17]. Анализ последовательностей штаммов в нашем исследовании показал, что у различных филогенетических групп античного биовара присутствуют разные варианты мутаций в этих генах. В геноме *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 в гене α -компонента сульфитредуктазы *cysJ* присутствует область с тремя повторами последовательности длиной 18 п.н. У всех штаммов *Y. pestis* античного биовара делетирован один из этих повторов (делеция 18 п.н.), в то время как у штаммов филогенетической ветви 1.ANT делетированы два повтора (делеция 36 п.н.). Обратная ситуация наблюдается в гене *ssuA* субстрат-связывающего белка сульфонатной транспортной системы, в котором у штаммов *Y. pestis* произошло увеличение количества повторов последовательности длиной 15 п.н., характерной для *Y. pseudotuberculosis* IP 32953. При том что у всех штаммов античного биовара нами выявлено три повтора (инсерция 30 п.н.), у штаммов филогенетической ветви 2.ANT3 из Китая, России и Монголии и 4.ANT из Монголии и России (все штаммы из Республики Алтай и два штамма из Республики Тыва [*Y. pestis* М-1944 и 209]) присутствуют только два повтора (инсерция 15 п.н.).

Значительный интерес представляло изучение филогенетической группы 4.ANT, внутри которой наблюдается вариабельность зависимости роста от этой аминокислоты. На основании результатов анализа питательных потребностей, состояния генов и филогенетических связей внутри этой группы можно выделить четыре популяции: два штамма *Y. pestis* из Тывы 1971 и 1987 гг. выделения (ауксотрофы по цистеину); два штамма *Y. pestis* из Тывы 2012 и

2015 гг. выделения (вариабельны по зависимости от цистеина); семь штаммов *Y. pestis* из Алтая (вариабельны по зависимости от цистеина); четыре штамма *Y. pestis* из Монголии (не зависят от цистеина).

В основании кластера филогенетической ветви 4.ANT лежат ауксотрофные по цистеину штаммы *Y. pestis* 2060 и KM932 из Тувинского очага чумы (1971 и 1987 гг. выделения соответственно) (рис. 1). Эти штаммы имеют уникальную мутацию (Т→С, 35-я позиция гена, Val→Ala) в гене *YPO1319*, кодирующем предполагаемую пермеазу ABC-транспортера D-метионина. У этих штаммов, как и у штаммов других филогенетических ветвей античного биовара, в гене *ssuA* содержится инсерция 30 п.н.

Инсерция 15 п.н. в гене *ssuA* присутствует как у двух штаммов *Y. pestis* М-1944 и 209 из Тывы 2012 и 2015 гг. выделения, так и у популяций штаммов из Алтая и Монголии. У всех этих штаммов также выявлена делеция в 52 п.н. в гене *cysM* (*YPO3011*) S-сульфо-L-цистеинсинтазы. Большинство штаммов этой группы не являются ауксотрофами по цистеину, и, значит, выявленные мутации не влияют на проявление этого признака. Исключение составляют штаммы *Y. pestis* М-1944 из Тувинского, 1097 и 50 из Горно-Алтайского очагов, однако специфичных замен у этих штаммов, связанных с ауксотрофностью по цистеину, не обнаружено.

Для установления генетических причин потребности в лейцине у штаммов *Y. pestis* античного биовара нами проанализированы последовательности генов *leuABCD* и *ilvE*, участвующих в биосинтезе этой аминокислоты (рис. 3). При анализе геномов штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 0.ANT5 выявлена делеция в размере 11 п.н. в гене *leuA* (1409–1419-я позиции гена), кодирующем синтез 2-изопропилмалатсинтазы. Эта мутация приводит

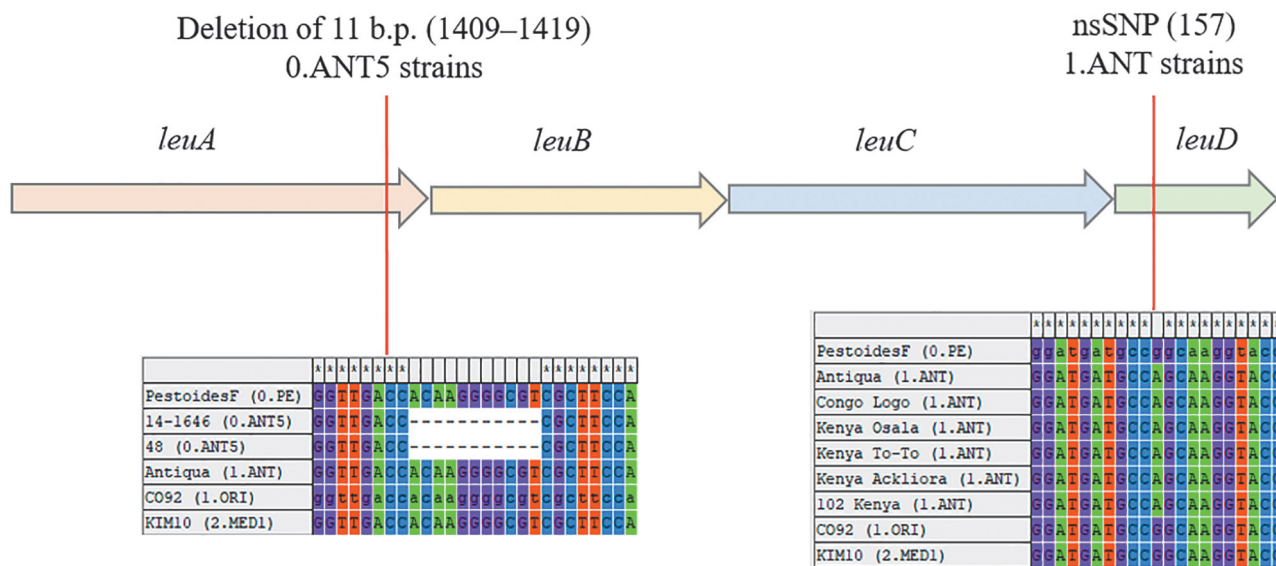


Рис. 3. Специфические мутации, характерные для штаммов *Y. pestis* филогенетических ветвей 0.ANT5 и 1.ANT античного биовара в генах оперона *leuABCD* (визуализированы в программе Mega 7.0). В скобках показаны координаты мутации от начала гена

Fig. 3. Specific mutations characteristic of *Y. pestis* strains of phylogenetic branches 0.ANT5 and 1.ANT of antiqua biovar in the genes of the *leuABCD* operon (visualized in the Mega 7.0 program). The position of the mutation from the beginning of the gene are shown in parentheses

к сдвигу рамки считывания и потере функциональности продукта и, вероятно, является причиной зависимости роста штаммов ветви 0.ANT5 от этой аминокислоты. У штаммов ветви 1.ANT в гене *leuD* малой субъединицы 3-изопропилмалатдегидратазы выявлен nsSNP (G→A, 157-я позиция гена, Gly→Ser). Возможно, менее интенсивный рост этой группы штаммов на среде в отсутствие лейцина связан с изменением конформации фермента из-за смены аминокислотного остатка.

Для поиска генетической детерминированности зависимости роста от пролина в штаммах *Y. pestis* филогенетической ветви 1.ANT мы провели анализ генов *proABC*, *poaA*, *pip*, продукты которых участвуют в синтезе этой аминокислоты. В гене *poaA* у всей группы штаммов выявлен nsSNP (G→A, 8-я позиция гена, Ser→Asn). Также в гене глутамин-5-киназы *proB* у штаммов, выделенных на территории ДПК, выявлен nsSNP (C→T, 149-я позиция гена, Ser→Phe). Однако обе выявленные мутации не могут однозначно объяснить ауксотрофность по этой аминокислоте. Следует сказать, что в геномах штаммов *Y. pestis* Nairobi и Antiqua выявлены мобильные элементы (IS100) в генах *proB* и *pip* соответственно, однако при анализе всех геномов *Y. pestis* античного биовара, использованных в настоящем исследовании, IS-элементы в этих генах не обнаружены.

Таким образом, впервые охарактеризованы питательные потребности штаммов филогенетических ветвей 1.ANT и 3.ANT2, а для ветвей 0.ANT3, 0.ANT5, 2.ANT3, 4.ANT данные по ауксотрофности уточнены в соответствии с расширением филогеографии штаммов, взятых в исследование. В настоящей работе изучение питательных потребностей проводили с учетом филогенетической принадлежности штаммов античного биовара. Применение этого подхода впервые привело к выявлению ауксотрофии по лейцину у штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 0.ANT5, а также к установлению генетической причины зависимости роста от этой аминокислоты. Ранее зависимость роста штаммов *Y. pestis* с территории Кыргызстана от присутствия в среде цистеина и лейцина связывали с географической принадлежностью к определенному очагу [6], тогда как в настоящем исследовании доказана четкая связь этого признака с филогенетической принадлежностью к ветви 0.ANT5. Установлена уникальная для штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 1.ANT зависимость роста от пролина, ранее описанная только для штаммов *Y. pestis* средневекового биовара ветви 2.MED0 из Центрально-Кавказского высокогорного очага [6, 18]. Однако при сравнении генов синтеза пролина этих групп штаммов генетической причины ауксотрофности по пролину выявить не удалось. Также следует отметить, что ранее при анализе роста штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории Кении и ДПК, отмечали дополнительные питательные потребности отдельных штаммов, для части штаммов питательные потребности не установлены [19]. В на-

шем исследовании потребности штамма *Y. pestis* 102 Kenya также установить не удалось, однако сравнить данные И.Л. Мартиневского [19] с результатами нашего исследования не представляется возможным ввиду отсутствия полногеномных последовательностей и, как следствие, данных о филогенетической принадлежности исследованных им штаммов. Для штаммов филогенетической ветви 2.ANT3 из Забайкальского степного очага чумы были описаны дополнительные питательные потребности в цистеине и для части штаммов в лейцине [6]. В нашем исследовании изучены штаммы 2.ANT3, выделенные в Китае и Монголии, что дополняет наши знания об этой филогенетической группе. Установленный факт вариабельности зависимости роста штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 4.ANT от присутствия в среде цистеина обращает на себя внимание в связи с его важностью для метаболизма патогенных бактерий. Так, выявлены связи между отсутствием синтеза цистеина и снижением устойчивости к окислительному стрессу *Salmonella typhimurium* [20] и *Mycobacterium tuberculosis* [21]. Первые сообщения о вариабельности зависимости от цистеина внутри популяции штаммов из Тувинского горного очага чумы опубликованы С.В. Балахоновым и соавт. [22], тогда как результаты нашего исследования доказывают, что это явление характерно также для популяции штаммов филогенетической ветви 4.ANT из Горно-Алтайского высокогорного очага. Выявленная вариабельность зависимости роста штаммов от присутствия в среде цистеина может быть следствием приспособления бактерий к локальным биоценозам. Закрепленные генетически изменения могут отражать микроэволюцию внутри отдельных филогеографических групп античного биовара в ходе приспособления к новым условиям окружающей среды. Результаты проведенного анализа питательных потребностей штаммов *Y. pestis* различных филогенетических ветвей античного биовара и их генетической детерминированности расширяют наши представления о фенотипических и генетических особенностях штаммов античного биовара *Y. pestis*, могут способствовать выяснению молекулярных механизмов микроэволюции этой обширной филогенетической группы высоковирулентных штаммов, а также могут быть использованы для дифференциации и типирования штаммов *Y. pestis* античного биовара из разных природных очагов мира.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. 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(7370):506–10. DOI: 10.1038/nature10549.

2. Harbeck M., Seifert L., Hänsch S., Wagner D.M., Birdsell D., Parise K.L., Wiechmann I., Grupe G., Thomas A., Keim P., Zöller L., Bramanti B., Riehm J.M., Scholz H.C. *Yersinia pestis* DNA from skeletal remains from the 6th century AD reveals insights into Justinianic Plague. *PLoS Pathog*. 2013; 9(5):e1003349. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003349.

3. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Wagglechner 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.

4. Spyrou M.A., Tukhbatova R.I., Feldman M., Drath J., Kacki S., Beltrán de Heredia J., Arnold S., Sitdikov 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.

5. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств. Калининград: ПА Полиграфичъ; 2022. 348 с.

6. Куклева Л.М., Одинокоев Г.Н., Шавина Н.Ю., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Сравнительный анализ питательных потребностей штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвигов и генетические причины их аутоотрофности. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 2:33–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-33-36.

7. Bearden S.W., Sexton C., Pare J., Fowler J.M., Arvidson C.G., Yerman L., Viola R.E., Brubaker R.R. Attenuated enzootic (pestoides) isolates of *Yersinia pestis* express active aspartase. *Microbiology (Reading)*. 2009; 155(Pt. 1):198–209. DOI: 10.1099/mic.0.021170-0.

8. Brubaker R.R. Interconversion of purine mononucleotides in *Pasteurella pestis*. *Infect. Immun*. 1970; 1(5):446–54. DOI: 10.1128/iai.1.5.446-454.1970.

9. Kanehisa M., Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(1):27–30. DOI: 10.1093/nar/28.1.27.

10. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Генетические основы вариативности признака редукции нитратов у штаммов *Yersinia pestis*. *Генетика*. 2014; 50(5):522–30. DOI: 10.7868/S001667581405004X.

11. 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.

12. 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; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.

13. Eroshenko G.A., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Oglodin Y.G., Kuleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzharapova A.K., Kutyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.

14. Parkhill J., Wren B.W., Thomson N.R., Titball R.W., Holden M.T., Prentice M.B., Sebahia M., James K.D., Churcher C., Mungall K.L., Baker S., Basham D., Bentley S.D., Brooks K., Cerdeño-Tarraga A.G., Chillingworth T., Cronin A., Davies R.M., Davis P., Dougan G., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Leather S., Moule S., Oyston P.C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., Barrell B.G. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*. 2001; 413(6855):523–7. DOI: 10.1038/35097083.

15. Одинокоев Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Павлова А.И., Кутырев В.В. Генетические основы метионинзависимости штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвигов. *Генетика*. 2011; 47(3):332–8.

16. Charusanti P., Chauhan S., McAteer K., Lerman J.A., Hyduke D.R., Motin V.L., Ansong C., Adkins J.N., Palsson B.O. An experimentally-supported genome-scale metabolic network reconstruction for *Yersinia pestis* CO92. *BMC Syst. Biol*. 2011; 5:163. DOI: 10.1186/1752-0509-5-163.

17. Chain P.S., Carniel E., Larimer F.W., Lamerdin J., Stoutland P.O., Regala W.M., Georgescu A.M., Vergez L.M., Land M.L., Motin V.L., Brubaker R.R., Fowler J., Hinnebusch J., Marceau M.,

Medigue C., Simonet M., Chenal-Francisque V., Souza B., Dacheux D., Elliott J.M., Derbise A., Hauser L.J., Garcia E. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101(38):13826–31. DOI: 10.1073/pnas.0404012101.

18. Сучков Ю.Г., Розанова Г.Н., Елкин Ю.М., Грамотина Л.И. Естественная генетическая маркировка штаммов чумного микроба из природных очагов Кавказа. *Проблемы природной очаговости чумы*. 1980; 2:35–7.

19. Мартиневский И.И. К изучению особенностей штаммов чумного микроба, выделенных в некоторых районах Африки. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1975; 42(2):10–3.

20. Turnbull A.L., Surette M.G. Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Res. Microbiol*. 2010; 161(8):643–50. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.06.004.

21. Brunner K., Maric S., Reshma R.S., Almqvist H., Seashore-Ludlow B., Gustavsson A.L., Poyraz O., Yogeewari P., Lundbäck T., Vallin M., Sriram D., Schnell R., Schneider G. Inhibitors of the cysteine synthase CysM with antibacterial potency against dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem*. 2016; 59(14):6848–59. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00674.

22. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.

References

1. Bos K.I., Schuenemann V.J., Golding G.B., Burbano H.A., Wagglechner 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(7370):506–10. DOI: 10.1038/nature10549.

2. Harbeck M., Seifert L., Hänsch S., Wagner D.M., Birdsell D., Parise K.L., Wiechmann I., Grupe G., Thomas A., Keim P., Zöller L., Bramanti B., Riehm J.M., Scholz H.C. *Yersinia pestis* DNA from skeletal remains from the 6th century AD reveals insights into Justinianic Plague. *PLoS Pathog*. 2013; 9(5):e1003349. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003349.

3. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Wagglechner 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.

4. Spyrou M.A., Tukhbatova R.I., Feldman M., Drath J., Kacki S., Beltrán de Heredia J., Arnold S., Sitdikov 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.

5. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Atlas of Natural Plague Foci in Russia and Foreign Countries]. Kaliningrad; 2022. 348 p.

6. Kuleva L.M., Odiнокоев Г.Н., Шавина Н.Ю., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Comparative analysis of the nutrient requirements among *Yersinia pestis* strains of the main and non-main sub-species as well as genetic causes of their auxotrophy]. *Problemy Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (2):33–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-33-36.

7. Bearden S.W., Sexton C., Pare J., Fowler J.M., Arvidson C.G., Yerman L., Viola R.E., Brubaker R.R. Attenuated enzootic (pestoides) isolates of *Yersinia pestis* express active aspartase. *Microbiology (Reading)*. 2009; 155(Pt. 1):198–209. DOI: 10.1099/mic.0.021170-0.

8. Brubaker R.R. Interconversion of purine mononucleotides in *Pasteurella pestis*. *Infect. Immun*. 1970; 1(5):446–54. DOI: 10.1128/iai.1.5.446-454.1970.

9. Kanehisa M., Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(1):27–30. DOI: 10.1093/nar/28.1.27.

10. Eroshenko G.A., Odiнокоев Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Кутырев В.В. [Genetic basis of variability of the nitrate reduction feature in *Yersinia pestis* strains]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 2014; 50(5):522–30. DOI: 10.7868/S001667581405004X.

11. 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.

12. 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; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
13. Eroshenko G.A., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Oglodin Y.G., Kukleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzhaparova A.K., Kuttyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch O.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.
14. Parkhill J., Wren B.W., Thomson N.R., Titball R.W., Holden M.T., Prentice M.B., Sebaihia M., James K.D., Churcher C., Mungall K.L., Baker S., Basham D., Bentley S.D., Brooks K., Cerdeño-Tarraga A.M., Chillingworth T., Cronin A., Davies R.M., Davis P., Dougan G., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Leather S., Moule S., Oyston P.C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., Barrell B.G. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*. 2001; 413(6855):523–7. DOI: 10.1038/35097083.
15. Odinokov G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Pavlova A.I., Kuttyrev V.V. [Genetic basis of methionine dependence of *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 2011; 47(3):332–8.
16. Charusanti P., Chauhan S., McAteer K., Lerman J.A., Hyduke D.R., Motin V.L., Ansong C., Adkins J.N., Palsson B.O. An experimentally-supported genome-scale metabolic network reconstruction for *Yersinia pestis* CO92. *BMC Syst. Biol.* 2011; 5:163. DOI: 10.1186/1752-0509-5-163.
17. Chain P.S., Carniel E., Larimer F.W., Lamerdin J., Stoutland P.O., Regala W.M., Georgescu A.M., Vergez L.M., Land M.L., Motin V.L., Brubaker R.R., Fowler J., Hinnebusch J., Marceau M., Medigue C., Simonet M., Chenal-Francisque V., Souza B., Dacheux D., Elliott J.M., Derbise A., Hauser L.J., Garcia E. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101(38):13826–31. DOI: 10.1073/pnas.0404012101.
18. Suchkov Yu.G., Rozanova G.N., Elkin Yu.M., Gramotina L.I. [Natural genetic marking of plague microbe strains from natural foci of the Caucasus]. *Problemy Prirodnoy Ochagovosti Chumy [Problems of Natural Focality of Plague]*. 1980; (2):35–7.
19. Martinevsky I.L. [Regarding the study of features of plague microbe strains isolated in some regions of Africa]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 1975; 42(2):10–3.
20. Turnbull A.L., Surette M.G. Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Res. Microbiol.* 2010; 161(8):643–50. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.06.004.
21. Brunner K., Maric S., Reshma R.S., Almqvist H., Seashore-Ludlow B., Gustavsson A.L., Poyraz Ö., Yogeeswari P., Lundbäck T., Vallin M., Sriram D., Schnell R., Schneider G. Inhibitors of the cysteine synthase CysM with antibacterial potency against dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* 2016; 59(14):6848–59. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00674.
22. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia and Siberia]. Moscow: “Medicine”; 2004. 192 p.

Authors:

Makashova M.A., Kukleva L.M., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Kovrizhnikov A.V., Eroshenko G.A., Shvidenko I.G., Kuttyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

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

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-106-114

УДК 616.995.7:614.4

О.В. Мельникова¹, Н.А. Быкова², Н.В. Устинова², Е.И. Андаев¹**Социально-демографические и эколого-эпидемиологические параметры заболеваемости клещевыми инфекциями в Прибайкалье**¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация; ²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области», Иркутск, Российская Федерация

Цель работы – сравнение основных социально-демографических и эколого-эпидемиологических параметров заболеваемости при клещевом вирусном энцефалите, иксодовых клещевых боррелиозах и клещевом риккетсиозе. **Материалы и методы.** В работе использованы базы данных на основе карт эпидемиологического расследования по клещевому вирусному энцефалиту и иксодовым клещевым боррелиозам с 1995 по 2022 г. и по клещевому риккетсиозу с 2001 по 2022 г. (всего 2974 случая по г. Иркутску и Иркутскому району). **Результаты и обсуждение.** Проанализированы следующие параметры: сроки наступления эпидемического сезона, география распространения, локализация присасывания клеща на теле человека, продолжительность инкубационного периода, половозрастная структура больных, их социальный состав и обстоятельства заражения. Показано, что исследованные параметры имеют особенности для каждого заболевания, часть которых являются общими для всего евразийского ареала этих инфекций. К ним относятся: более раннее наступление эпидемического сезона клещевого риккетсиоза; более короткая продолжительность инкубационного периода при клещевом риккетсиозе по сравнению с клещевым вирусным энцефалитом и иксодовыми клещевыми боррелиозами; повышенная частота присасывания переносчиков клещевого риккетсиоза в области головы и шеи пострадавших, а переносчиков иксодовых клещевых боррелиозов – в области туловища; большой процент лиц пожилого возраста среди больных иксодовыми клещевыми боррелиозами и детей до 14 лет среди больных клещевым риккетсиозом; преобладание лиц мужского пола в числе инфицированных всеми рассмотренными патогенами. К региональной специфике можно отнести низкую инцидентность клещевых инфекций среди профессионального контингента (работа, связанная с пребыванием в природных очагах), а также повышенный риск заболевания клещевым вирусным энцефалитом и клещевым риккетсиозом в социальной группе «безработные», а иксодовыми клещевыми боррелиозами – среди пенсионеров.

Ключевые слова: клещевой вирусный энцефалит (КВЭ), иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ), клещевой риккетсиоз (КР), структура заболеваемости, Прибайкалье.

Корреспондирующий автор: Мельникова Ольга Витальевна, e-mail: melnikovaovit@gmail.com.

Для цитирования: Мельникова О.В., Быкова Н.А., Устинова Н.В., Андаев Е.И. Социально-демографические и эколого-эпидемиологические параметры заболеваемости клещевыми инфекциями в Прибайкалье. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:106–114. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-106-114

Поступила 30.01.2023. Отправлена на доработку 02.03.2023. Принята к публ. 20.09.2023.

O.V. Mel'nikova¹, N.A. Bykova², N.V. Ustinova², E.I. Andaev¹**Socio-Demographic and Eco-Epidemiological Parameters of Tick-Borne Infections Morbidity in Baikal Region**¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation;²Center of Hygiene and Epidemiology in Irkutsk Region, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to compare the main socio-demographic and eco-epidemiological parameters of tick-borne viral encephalitis, tick-borne borrelioses and tick-borne rickettsiosis. **Materials and methods.** The authors' databases based on epidemiological investigation records were used for the study. All in all, 2974 cases (Irkutsk and the Irkutsk district) were analyzed during the periods of 1995–2022 for tick-borne viral encephalitis and tick-borne borrelioses, and 2001–2022 for tick-borne rickettsiosis. **Results and discussion.** The following parameters were assessed: the timing of epidemic season; the geography of prevalence; localization of tick bite on the human body; incubation time; gender and age structure of patients; social composition and exposure conditions. It was shown, that the parameters had their own features for each disease, and part of them are common to all Eurasian area of these infections. The shared characteristics include: the early epidemic season onset for tick-borne rickettsiosis; the shorter incubation time for tick-borne rickettsiosis as compared to tick-borne viral encephalitis and tick-borne borrelioses; the increased frequency of tick-borne rickettsiosis vectors' bites near the head and neck, and tick-borne borrelioses vectors – on the torso; large percentage of older persons among patients with tick-borne borrelioses and children under 14 years of age among patients with tick-borne rickettsiosis; prevalence of male population over female one as regards all surveyed pathogens. Low incidence of tick-borne diseases among professional contingent (the work associated with staying in natural foci of infection), an increased risk of tick-borne encephalitis and rickettsiosis among social group “unemployed”, and tick-borne borrelioses – among retirees, can be attributed to regional specificity.

Key words: tick-borne encephalitis (TBE), tick-borne borrelioses (TBB), tick-borne rickettsiosis (TBR), structure of morbidity, Baikal Region.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Olga V. Mel'nikova, e-mail: melnikovaovit@gmail.com.

Citation: Mel'nikova O.V., Bykova N.A., Ustinova N.V., Andaev E.I. Socio-Demographic and Eco-Epidemiological Parameters of Tick-Borne Infections Morbidity in Baikal Region. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:106–114. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-106-114

Received 30.01.2023 Revised 02.03.2023. Accepted 20.09.2023.

Mel'nikova O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5133-0323>

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

Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, представляют большую проблему для здравоохранения. Самые распространенные из них в умеренном поясе Российской Федерации – клещевой вирусный энцефалит (КВЭ) и иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – характеризуются высокой величиной социально-экономического бремени заболеваний [1]. Клещевой риккетсиоз (КР) наряду с КВЭ и ИКБ входит в тройку наиболее значимых и распространенных инфекций в России, передаваемых через присасывание иксодовых клещей [2]. При этом одной из основных тенденций современной эпидемиологической ситуации является преобладание в структуре заболеваемости городских жителей [3–5]. Частоту встречи населения с возбудителем определяют как экологические, так и социальные факторы, которые необходимо учитывать для объективной оценки уровня риска заражения инфекциями, переносимыми клещами. Эти факторы имеют региональные особенности, а также специфику по каждой инфекции. Ранее нами подробно описаны демографические, социальные, экологические факторы, определяющие заболеваемость КВЭ и ИКБ у жителей г. Иркутска [6, 7]. **Цель** настоящей работы – сравнение основных социально-демографических и эколого-эпидемиологических параметров заболеваемости тремя наиболее распространенными в Прибайкалье трансмиссивными клещевыми инфекциями: клещевым вирусным энцефалитом, иксодовыми клещевыми боррелиозами и клещевым риккетсиозом.

Материалы и методы

В работе использованы авторские базы данных (свидетельства о государственной регистрации от 31.01.2013 № 2013620219 и 2013620220 и от 19.02.2020 № 2020620324), основанные на картах эпидемиологического расследования случаев КЭ (n=1659), ИКБ (n=1014) с 1995 по 2022 г. и КР (n=301) с 2001 по 2022 г., предоставленных ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области». Проанализированы все зафиксированные случаи заболеваний за исследуемые периоды. Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами (критерий Стьюдента, корреляционный анализ, вычисление среднего стандартного отклонения) с помощью программы Microsoft Excel. Результаты считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Динамика инцидентности анализируемых инфекций отражена на рис. 1. Максимальное число

случаев заболевания КВЭ среди жителей Иркутска имело место в 1999 г. (n=199), ИКБ – в 1996 и 1998 гг. (по 76 случаев), КР – в 2011 г. (n=39) (рис. 1, А). Минимумы отмечены в 2020 и 2021 гг., что, скорее всего, обусловлено пандемией COVID-19 и связанным с ней перераспределением ресурсов оказания медицинской помощи. С 2003 г. до конца исследуемого периода достоверных линейных трендов в динамике КЭ, ИКБ и КР не прослеживается (рис. 1, В). В структуре заболеваемости, начиная с 2001 г. (с которого имеются сведения по всем трем инфекциям), доля КВЭ составляет 47,1 %, ИКБ – 35,5 % и КР – 17,4 %.

Заражение иркутян описываемыми инфекциями происходило в основном на территории Прибайкалья (Иркутская область и Республика Бурятия). За пределами этих территорий произошло инфицирование КВЭ 15 человек (в соседних Красноярском и Забайкальском краях – 6 и 4 человека соответственно; в Свердловской области – 2 и по 1 случаю – в Приморском, Алтайском краях и Вологодской области). ИКБ в других регионах Российской Федерации заразились 14 человек (Красноярский край – 5; Забайкальский край и Новосибирская область – по 2; Хабаровский, Камчатский, Алтайский края, Свердловская и Амурская области – по 1), за пределами РФ – 3 человека (Прибалтика, Австрия и Монголия). Четверо иркутян заболели КР после посещения Забайкальского края, Республики Хакасия, Амурской и Новосибирской областей.

На территории Прибайкалья инфицирование рассматриваемыми патогенами имело географические различия (рис. 2). В Иркутской области основная доля заражения КВЭ и ИКБ приходилась на лесные зоны и рекреационные территории, прилегающие к радиально расположенным от областного центра трассам федерального и регионального значения (не далее 100 км). При этом половина всех случаев заражения КВЭ и ИКБ имела место вдоль Байкальского и Голоустненского трактов, а также в черте самого города Иркутска. В Республике Бурятия инфицирование происходило в основном в наиболее посещаемых туристами Тункинском и Кабанском районах. География встреч с патогенными риккетсиями отличалась своеобразием: большая часть заражений происходила в степных и лесостепных районах Усть-Ордынского Бурятского округа и Ольхонском районе – местах обитания основных переносчиков сибирского сыпного тифа – клещей рода *Dermacentor*.

Первые случаи присасывания инфицированных переносчиков приходились на конец марта (самый ранний – 28 марта), последние – на начало октября (самый поздний случай – 4 октября). Самый ранний

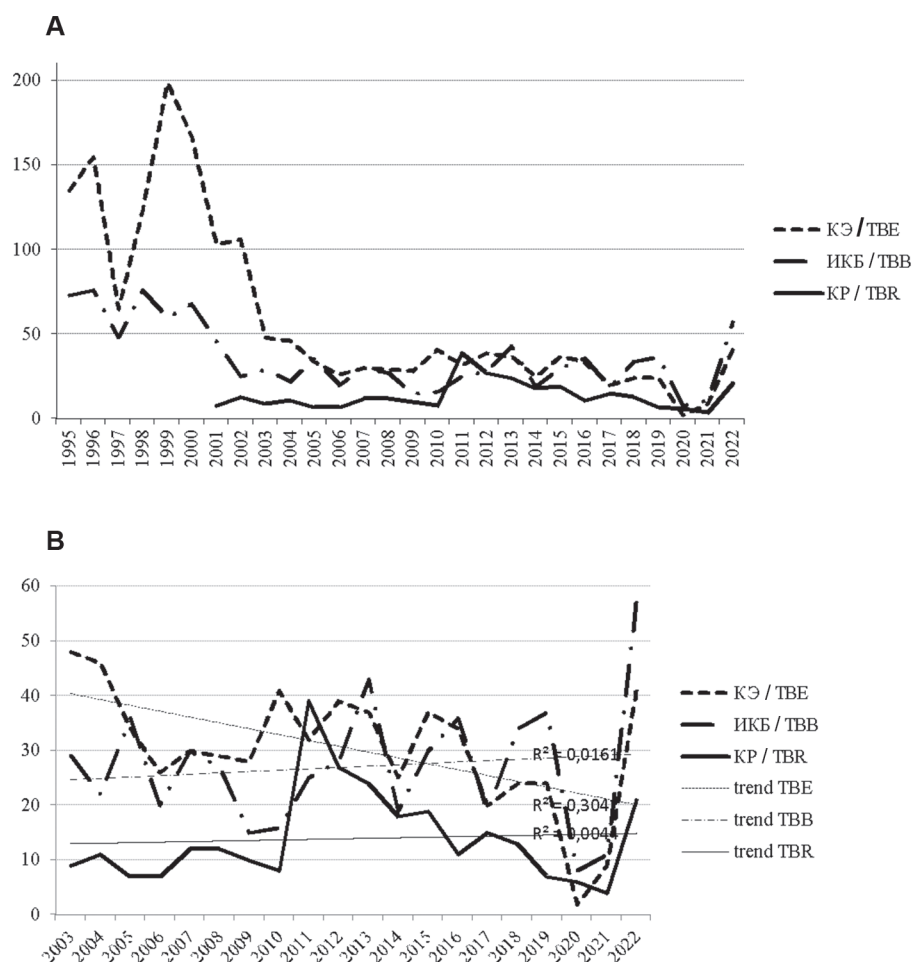


Рис. 1. Динамика случаев заболевания клещевыми инфекциями жителей г. Иркутска:

A – 1995–2022 гг.; B – 2003–2022 гг. По вертикальной оси – абсолютное число случаев; по горизонтальной – годы

Fig. 1. The incidence dynamics of tick-borne diseases in residents of Irkutsk:

A – 1995–2022; B – 2003–2022. The vertical axis shows the absolute number of cases; the horizontal axis – years. TBE – tick-borne encephalitis; TBB – tick-borne borreliosis; TBR – tick-borne rickettsiosis

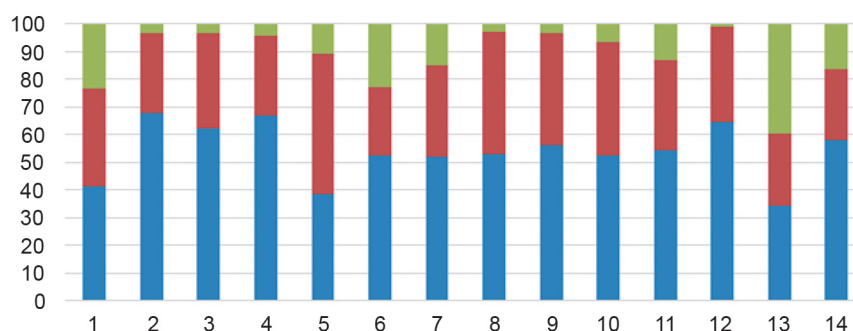


Рис 2. География мест заражений жителей Иркутска трансмиссивными клещевыми инфекциями:

по горизонтальной оси – места заражения: 1 – Александровский тракт; 2 – Байкальский тракт; 3 – Республика Бурятия; 4 – Голоустненский тракт; 5 – черта города Иркутска; 6 – Иркутский район; 7 – Качугский тракт; 8 – Култукский тракт; 9 – Мельничный тракт; 10 – Московский тракт; 11 – северные районы; 12 – Слюдянский район; 13 – Усть-Ордынский Бурятский округ и Ольхонский район; 14 – прочие места; по вертикальной оси – доля больных, заразившихся на данной территории; синий цвет – КВЭ; красный – ИКБ; зеленый – КР

Fig. 2. The geography of sites of tick-borne infection acquisition by residents of Irkutsk:

the vertical axis is the percentage of patients infected in the territory: 1 – Aleksandrovsky Route; 2 – Baikalsky Route; 3 – Buryat Republic; 4 – Goloustnensky Route; 5 – Irkutsk area; 6 – Irkutsk District; 7 – Kachugsky Route; 8 – Kultuisky Route; 9 – Mel' nichny Route; 10 – Moscovsky Route; 11 – northern districts; 12 – Slyudyansky District; 13 – Ust-Orda Buryat District and Ol'khonsky District; 14 – other areas; the horizontal axis – infection sites; blue color – tick-borne encephalitis; red one – tick-borne borreliosis; and green one – tick-borne rickettsiosis

случай заболевания имел место 30 марта (ИКБ), самый поздний – 11 октября (КР). Пики нападения клещей, переносающих разные патогены, и пики заболеваний различались (табл. 1) и были самыми ранними при КР. Продолжительность инкубационного периода колебалась от 0 до 109, 99 и 67 суток при КВЭ, ИКБ и КР соответственно. Инкубационный период

при КР в среднем был достоверно короче, чем при КВЭ (8,4 против 10,8 дня; $t=3,54$; $df=323$; $P<0,001$) и ИКБ (8,4 против 10,6 дня; $t=3,03$; $df=403$; $P<0,01$).

Локализация присасывания клеща на теле пострадавших имела особенности при каждой из инфекций (табл. 1). Присасывания в область головы и шеи при КР происходили в половине случаев, что в

Таблица 1 / Table 1

Эколого-эпидемиологические и социально-демографические параметры заражения и заболевания трансмиссивными клещевыми инфекциями жителей Иркутска
Ecological, epidemiological and socio-demographic parameters of tick-borne diseases in residents of Irkutsk

Параметры Parameters	Клещевой энцефалит Tick-borne encephalitis	Иксодовые клещевые боррелиозы Tick-borne borrelioses	Клещевой риккетсиоз Tick-borne rickettsiosis
1	2	3	4
Пик присасываний клещей The period when tick bites are most frequent	18 июня June, 18	12 июня June, 12	1 июня June, 1
Пик заболеваний Peak of diseases	29 июня June, 29	23 июня June, 23	13 июня June, 13
Инкубационный период, дней Incubation period, days	10,8±0,24	10,6±0,34	8,4±0,63
Доля мужчин среди заболевших, % The share of male population among patients, %	68,5±1,14	57,9±1,55	58,8±2,84
Число повторных заболеваний Number of recurrent cases	5	2	0
Локализация присасывания клеща, % / Localization of tick bite, %			
Голова, шея / Head and neck	27,6±1,20	22,1±1,40	50,0±3,31
Туловище / Torso	26,0±1,18	36,9±1,63	13,2±2,24
Руки и подмышки / Hands and armpits	22,2±1,11	20,2±1,36	21,5±2,72
Ноги и пах / Legs and groin	16,5±1,00	17,2±1,27	10,5±2,03
Множественные присасывания / Multiple bites	7,7±0,72	3,5±0,62	4,8±1,42
Отрицают присасывание Patients deny the fact of being bitten	6,9±0,62	5,9±0,74	8,3±1,59
Возрастная структура / Age structure			
Средний возраст больных, лет The average age of patients, years	33,9±0,48	40,4±0,69	29,2±1,28
0–6 лет, % / 0–6 years, %	7,1±0,63	9,0±0,90	22,6±2,41
7–14 лет, % / 7–14 years, %	13,6±0,84	11,1±0,99	15,9±2,11
15–19 лет, % / 15–19 years, %	7,8±0,66	2,8±0,52	5,6±1,33
20–29 лет, % / 20–29 years, %	16,1±0,90	9,5±0,92	9,0±1,65
30–39 лет, % / 30–39 years, %	15,8±0,90	11,6±1,01	10,6±1,78
40–49 лет, % / 40–49 years, %	14,9±0,88	15,2±1,13	12,3±1,89
50–59 лет, % / 50–59 years, %	12,6±0,82	17,5±1,19	13,0±1,94
60–69 лет, % / 60–69 years, %	8,8±0,69	15,8±1,15	8,3±1,59
70–79 лет, % / 70–79 years, %	2,8±0,41	6,5±0,78	2,7±0,93
80 лет и старше, % / 80 years and above, %	0,4±0,16	1,1±0,33	0
Социальный состав, % / Social structure, %			
Рабочие и служащие Workers and office employees	36,9±1,20	39,3±1,55	28,0±2,62
Школьники / Schoolchildren	15,6±0,90	9,9±0,95	15,7±2,13
Студенты / Students	5,0±0,54	2,8±0,52	2,4±0,89
Организованные дошкольники Organized preschoolers	4,5±0,51	5,5±0,72	10,9±1,82
Неорганизованные дошкольники Unorganized preschoolers	4,6±0,52	5,1±0,70	14,0±2,03

Окончание табл. 1 / Ending of table 1

1	2	3	4
Пенсионеры и инвалиды Retirees and disabled persons	13,5±0,85	23,2±1,34	12,6±1,94
Безработные / Unemployed	19,1±0,97	13,6±1,08	16,0±2,14
Незанятое население в целом Nonworking population on the whole	32,6±1,16	36,7±1,53	28,7±2,64
Группа профессионального риска Occupational risk group	0,8±0,22	0,6±0,25	0,3±0,34
Обстоятельства заражения, % / Exposure circumstances, %			
Отдых на природе / Outdoor recreation	63,7±1,23	53,2±1,65	41,2±1,36
Дача, огород / Gardens and vegetable plots	12,4±0,84	17,9±1,27	37,3±1,27
Сбор дикоросов / Collecting herbs	17,5±0,97	14,3±1,16	4,7±0,20
Другие причины / Other	6,5±0,63	14,6±1,17	16,7±0,66

2,3 раза чаще, чем при ИКБ, и почти в 2 раза чаще, чем при КВЭ. Переносчиков ИКБ статистически значимо обнаруживали на туловище ($P<0,001$ как при сравнении с КВЭ, так и при сравнении с КР). В целом распределение укусов на теле пострадавших от переносчиков КВЭ было более равномерным, чем при двух других заболеваниях.

В табл. 1 представлены основные социально-демографические параметры заражения трансмиссивными клещевыми инфекциями жителей г. Иркутска. Распределение больных рассматриваемыми инфекциями по полу неодинаково. Несмотря на то, что мужчины составляли более половины во всех трех группах, их доля среди пациентов с ИКБ и КР значимо меньше, чем пациентов с КВЭ ($P<0,001$ в обоих случаях).

Возрастная структура пациентов также заметно различалась по нозоформам. Среди больных КВЭ были пациенты от 1 года до 85 лет, ИКБ – от 1 года до 88 лет, КР – от 9 месяцев до 79 лет. В среднем больные ИКБ были значительно старше как больных КВЭ ($t=7,73$; $df=1944$; $P<0,001$), так и больных КР ($t=7,68$; $df=489$; $P<0,001$). Имелись значительные различия и по возрастным группам. Детей до 6 лет среди заболевших КР было достоверно больше, чем в выборках по двум другим инфекциям ($P<0,001$ в обо-

их случаях). Подростки 15–19 лет чаще болели КВЭ и КР, чем ИКБ ($P<0,001$ и $P<0,05$ соответственно). Молодых людей 20–29 лет было значительно больше среди пациентов с КВЭ ($P<0,001$ в сравнении как с ИКБ, так и с КР); та же картина в возрастной группе 30–39 лет ($P<0,001$ в обоих случаях). Наоборот, во всех старших возрастных группах (начиная с 50 лет) преобладают больные ИКБ.

Интересно, что присасывание клеща в область головы и шеи в случае КВЭ и ИКБ происходило в большинстве случаев у детей до 14 лет, а при КР – не в такой степени связано с определенной возрастной группой, хотя тенденция уменьшения вероятности укусов в голову с увеличением возраста прослеживается (табл. 2). Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена следующие: при КВЭ $r_s = -0,943$; $P<0,01$; при ИКБ $r_s = -0,657$; $P<0,05$; при КР $r_s = -0,771$; $P<0,05$; $n=6$ во всех случаях.

При анализе социального состава заболевших выяснилось, что от 57 до 73 % всех пациентов составляют две социальных группы: рабочие и служащие и незанятое население, – представленные почти в равных долях (табл. 1). При этом имелись значимые отличия в долях пациентов разных социальных групп. Процент незанятого населения в целом среди больных КВЭ и КР достоверно меньше, чем среди

Таблица 2 / Table 2

Доля присасываний клещей в область головы и шеи у больных разных возрастных групп при клещевом энцефалите, иксодовых клещевых боррелиозах и клещевых риккетсиозах

The percentage of tick bites near the head and neck among different age groups of patients with tick-borne encephalitis, tick-borne borrelioses and tick-borne rickettsiosis

Возрастные группы Age groups	Клещевой энцефалит, % Tick-borne encephalitis, %	Иксодовые клещевые боррелиозы, % Tick-borne borrelioses, %	Клещевой риккетсиоз, % Tick-borne rickettsiosis, %
0–14 лет / 0–14 years	60,7±2,94	69,5±3,56	60,2±5,22
15–19 лет / 15–19 years	23,3±4,17	23,5±3,28	57,1±13,23
20–29 лет / 20–29 years	20,4±2,63	8,0±2,10	52,2±10,42
30–39 лет / 30–39 years	20,6±2,76	12,9±2,59	33,3±9,07
40–49 лет / 40–49 years	18,9±2,73	9,7±2,29	40,7±9,46
50 лет и старше / 50 years and above	17,5±2,02	8,3±2,14	42,0±6,98

больных ИКБ (36,2 и 28,7 % против 36,8 % соответственно; $t=2,17$; $df=894$; $P<0,05$ – для КВЭ и ИКБ; $t=2,65$; $df=448$; $P<0,01$ – для ИКБ и КР). При этом в выборке пациентов с ИКБ преобладали пенсионеры, в основном женщины ($t=6,15$; $df=894$; $P<0,001$), а среди больных КВЭ – безработные, в основном мужчины до 35 лет ($t=3,81$; $df=894$; $P<0,001$). Школьников и студентов, заболевших КВЭ, было значительно больше, чем заболевших ИКБ ($t=4,36$; $df=351$; $P<0,001$ и $t=2,93$; $df=107$; $P<0,01$ соответственно). Дошкольники (как организованные, так и неорганизованные) значительно преобладали среди пациентов с КР по сравнению с остальными: 26,6 % КР, 10,6 % ИКБ, 9,1 % КВЭ ($t=5,79$; $df=182$; $P<0,001$ и $t=6,54$; $df=224$; $P<0,001$ соответственно). Следует отметить, что группа профессионального риска заражения составила менее 1 % по каждой нозоформе.

В качестве обстоятельства, при котором произошло заражение, пострадавшие чаще всего указывали отдых на природе. Большую долю составили также работа на садовом или огородном участке и сбор дикоросов. Среди других причин: посещение кладбищ, охота, рыбалка, покос, отдых или выполнение профессиональных обязанностей в детских оздоровительных и спортивных лагерях, санаториях и пр. Обращает на себя внимание значительное преобладание заразившихся в процессе работы на приусадебных участках среди больных КР: 37,3 % против 17,9 % больных ИКБ и 12,4 % больных КВЭ ($t=10,80$; $df=248$ и $t=19,60$; $df=274$ соответственно; $P<0,001$ в обоих случаях). Доля пациентов с ИКБ, связывающих свое заболевание с пребыванием на даче и огороде, также выше, чем пациентов с КВЭ ($t=3,61$; $df=350$; $P<0,001$).

Зарегистрированы случаи повторных заболеваний КВЭ ($n=5$) и ИКБ ($n=2$), но не КР (возможно, из-за меньшей величины выборки). Среди переболевших дважды КВЭ – четверо взрослых мужчин и одна девочка. Заражение происходило с разницей во времени от 1 года до 5 лет, в трех случаях из пяти – в одной и той же местности. Повторные случаи ИКБ выявлены у двух пожилых женщин (в возрасте 69 лет каждая на момент первого заражения) с разницей в 1 год и 7 лет. Со слов пострадавших, присасывание клеща произошло во время работы на дачном участке (в обоих случаях – на тех же участках, что и в первый раз). Одна из пострадавших перенесла в первом случае эритемную, во втором – безэритемную форму заболевания, что наводит на мысль о возможном инфицировании разными видами боррелий.

Основными трансмиссивными природно-очаговыми инфекциями, связанными с иксодовыми клещами, от Урала до Дальнего Востока России являются КВЭ, ИКБ и КР. Преобладание их варьирует во времени и в пространстве. Активность переносчиков на этих территориях начинается с появлением первых проталин – в конце марта, а заканчивается с первым снегом – в конце сентября – начале октября. Начало эпидсезона КР в Иркутской области обычно

приходится на апрель – май, опережая на один месяц начало эпидсезона при КЭ и ИКБ (июнь – июль) [8]. Анализ нашей выборки показал, что пик заболеваемости КР приходится на начало второй декады июня, а ИКБ и КВЭ – на третью декаду июня.

Известно, что большинство встреч с клещами происходит не в лесу и даже не в местности, граничащей с лесом, а в рекреационных зонах [9]. Как минимум с середины 1970-х гг. от 25 до 40 % случаев заболеваний КВЭ жителей Иркутска и пригородов связывается с пребыванием на дачных участках и в зонах отдыха, расположенных вдоль Байкальского тракта [10, 11]. Инцидентность КР ассоциируется главным образом с Усть-Ордынским Бурятским округом и Ольхонским районом [8] в силу ландшафтных особенностей, благоприятных для клещей рода *Dermacentor* – основных переносчиков сибирского сыпного тифа. Анализ наших данных подтверждает эти наблюдения, в то же время указывая на другие опасные с точки зрения риска заражения участки, в частности – Голоустненское направление и черту областного центра.

По литературным данным, в Иркутской области продолжительность инкубационного периода колеблется при КВЭ от 1 до 58 дней (в среднем – 17,5) [12], при КР – от 1 до 15 дней (медианный – 3 дня) [13], по информации других исследователей – 9,3 дня [8]. При анализе стационарных карт пациентов с диагнозом «клещевой риккетсиоз» в ГБУЗ ОИКБ г. Тюмени инкубационный период составил в среднем 9,7 дня [14], в Республике Казахстан – 5,3 [15]. При ИКБ зафиксированы вариации продолжительности инкубационного периода от 1 до 30 дней (в среднем – 12,1) [16]. В целом его продолжительность при КР заметно короче, чем при КВЭ и ИКБ, что подтвердил и анализ нашей выборки.

Есть мнение, что «место прикрепления зараженного клеща – вещь совсем не безобидная с точки зрения возникновения и течения инфекции» [17, с. 85]. Замечено, например, что в случае КВЭ голова детей в 4 раза привлекательнее головы взрослых, а присасывание в районе подмышечной впадины вызывало максимальное количество смертельных исходов [17]. M. Blasko-Markic и M. Socan [18] также отмечают влияние возраста и пола пострадавших на локализацию присасывания клеща. Клещи, присосавшиеся к голове и шее, чаще встречались у дошкольников по сравнению со школьниками и взрослыми. То же замечено и при ИКБ [19]. Из мест предпочтительного присасывания переносчиков ИКБ на теле взрослых часть исследователей указывают на туловище [20, 21], другие – на нижние конечности [22]. Нами этот вопрос был детально разобран ранее [6, 7]. Что касается КР, имеются свидетельства предпочтения укусов в область головы и шеи не только у детей, но и у взрослых при передаче этой инфекции [8, 15]. В проанализированной нами выборке по трем инфекциям получилось, что укусы клещей при передаче ИКБ чаще всего локализовались на туловище,

КР – на голове и шее, при КВЭ распределялись почти равномерно по всем частям тела. В то же время у детей до 14 лет переносчики ИКБ и КВЭ также выбирали область головы и шеи.

Возраст и пол как дифференцирующие факторы риска заболевания клещевыми инфекциями отмечают многие исследователи, равно как и необходимость гендер-специфичных профилактических мер [5, 23, 24]. Чаще всего в качестве факторов риска для всех обсуждаемых заболеваний указывается мужской пол и возраст старше 50 лет [5, 12, 23, 25]. Но есть и другие наблюдения. Например, в Пермском крае и Челябинской области распределение заболеваемости КВЭ среди мужчин и женщин не имело достоверных различий [3, 26]. Р. Zeman и С. Benes [9], а также S. Cunze *et al.* [24] при сравнении половозрастных особенностей КВЭ и ИКБ отмечают, что в обоих случаях имеют место гендерные перекосы, но КВЭ чаще болеют мужчины, а ИКБ – женщины. В дополнение к этому Р. Zeman и С. Benes [9] фиксируют бимодальное распределение по возрастам при КВЭ (пики в 30 и 50 лет) и ИКБ (10 и 50 лет). Примерно одинаковое соотношение полов среди больных КР и большую долю детей до 14 лет (53,3 %) приводят Р.А. Егембердиева и соавт. [15]. На высокую уязвимость в отношении КР детей младших возрастных групп указывают и другие исследователи [27]. В нашей выборке представители мужского пола составляли больше половины заболевших при всех трех инфекциях, но в случае КВЭ их доля значимо превышала таковую при ИКБ и КР. В возрастной структуре лица 50 лет и старше составили 41 % от всех пострадавших от ИКБ и по 24 % – КВЭ и КР. Вместе с тем доля больных КР детей до 6 лет оказалась равной почти 23 %, а от 0 до 14 лет – 38 %, то есть сопоставимой с долей больных ИКБ старше 50.

На заболеваемость инфекциями, передаваемыми клещами, могут оказывать существенное влияние социальные и поведенческие факторы, приводящие к повышению частоты контакта с переносчиком в природных очагах. Они могут проистекать как от повышения уровня благосостояния населения (строительство коттеджных поселков в пригородах, увеличение автомобилизации населения и возможностей выезда за пределы городов) [28], так и от его снижения и необходимости в связи с этим сбора лесных даров. Поэтому представляет интерес анализ социальной структуры заболевших и обстоятельств, сопутствовавших заражению. Из обстоятельств заражения в литературе приводится работа горожан на дачных участках, отдых на природе, сбор дикоросов и т.д. [8, 15, 28, 29]. Выполнение профессиональных обязанностей в этом списке на сегодняшний день занимает одно из последних мест, хотя в некоторых странах и регионах РФ работа, связанная с пребыванием в лесу, до сих пор дает значительный процент заболеваний клещевыми инфекциями [25, 28, 29]. В исследованной нами выборке группа профессионального риска составила менее 1 % по

каждой из инфекций. В то же время от 30 % и более пострадавших представлено незанятым населением (пенсионеры и безработные). Во многих исследованиях по эпидемиологии природно-очаговых клещевых инфекций обращает на себя внимание большая доля (до 62 %) этой социальной группы среди заболевших [12, 15, 26, 29]. Следует отметить, что, по статистическим данным, уровень безработицы в Иркутской области в 2009–2014 гг. составлял от 10,8 до 8,8 % [30], в то время как доля неработающих в нашей выборке – 13,6–19,1 %. Наоборот, доля людей пенсионного возраста среди жителей Иркутска равна 17 %, а среди пациентов с КВЭ и КР – 13,5 и 12,6 % соответственно. Подобные результаты мы получали и при сопоставлении со статистическими данными других лет [7]. То есть пожилые люди, относительно их доли в популяции, чаще болеют ИКБ, но реже КР и КВЭ, тогда как безработные являются группой риска по всем рассматриваемым инфекциям. Значительное преобладание заразившихся в процессе работы на приусадебных участках среди больных КР объясняется спецификой заражения данной нозоформой в преимущественно сельских районах Усть-Ордынского Бурятского округа, где основным занятием населения является скотоводство и земледелие. Большая доля заразившихся на дачах пациентов с ИКБ ассоциируется с большей долей пенсионеров среди больных этой инфекцией.

Таким образом, социально-демографические и эколого-эпидемиологические параметры заболеваний КВЭ, ИКБ и КР имеют особенности, часть которых являются общими для всего евразийского ареала этих инфекций. К ним относятся: более раннее наступление эпидемического сезона КР; более короткая продолжительность инкубационного периода при КР по сравнению с КВЭ и ИКБ; повышенная частота присасывания переносчиков КР в области головы и шеи пострадавших, а переносчиков ИКБ – в области туловища; большой процент лиц пожилого возраста среди больных ИКБ и детей до 14 лет среди больных КР; преобладание лиц мужского пола в числе инфицированных всеми рассмотренными патогенами. К региональной специфике можно отнести низкую инцидентность клещевых инфекций среди профессионального контингента (работа, связанная с пребыванием в природных очагах), а также повышенный риск заболевания КВЭ и КР в социальной группе «безработные» и ИКБ – среди пенсионеров.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Платонов А.Е., Авксентьев Н.А., Авксентьева М.В., Деркач Е.В., Платонова О.В., Титков А.В., Колясникова Н.М. Социально-экономическое бремя пяти природно-очаговых инфекций в Российской Федерации. *Фармакоэкономика*.

Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2015; 8(1):47–56. DOI: 10.17749/2070-4909.2015.8.1.047-056.

2. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.В., Ястребов В.К., Оберт А.С., Курепина Н.Ю. Риккетсии и риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки в Сибири. Омск; 2012. 288 с.

3. Фельдблюм И.В., Девятков М.Ю., Касьяненко Е.В., Окунева И.А. Эпидемиологическая эффективность акарицидных обработок при клещевом энцефалите. Национальные приоритеты России. 2011; 2:63–4.

4. Дмитриева Г.М., Салымова Л.В., Кострыкина Т.В. Опыт практического применения системы эпидемиологического надзора за клещевым вирусным энцефалитом в Красноярском крае. Национальные приоритеты России. 2014; 3:63–5.

5. Скотарева М.А., Хисамиев И.И., Рожкова Е.В., Говорова В.Г., Зубарева А.П., Умикамалова Г.Г. Обеспечение эпидемиологического надзора за клещевым вирусным энцефалитом в Республике Башкортостан. Национальные приоритеты России. 2021; 3:267–9.

6. Мельникова О.В., Андаев Е.И., Никитин А.Я. Некоторые экологические и клинико-эпидемиологические характеристики клещевого энцефалита в г. Иркутске (1995–2015 гг.). Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017; 16(2):56–62.

7. Мельникова О.В., Андаев Е.И. Эпидемиологические проявления иксодовых клещевых боррелиозов в г. Иркутске и других частях евразийского ареала. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2019; 18(2):34–46. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-2-34-46.

8. Аитов К.А., Бурданова Т.М., Лемешевская М.В., Орлова Л.С., Малов С.И., Макарова С.В., Леоненко В.В., Котова И.В. К эпидемиологии клещевого риккетсиоза в Иркутской области. Журнал инфекционной патологии. 2018; 23(1-4):8.

9. Zeman P., Benes C. Spatial distribution of a population at risk: an important factor for understanding the recent rise in tick-borne diseases (Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in the Czech Republic). Ticks Tick Borne Dis. 2013; 4(6):522–30. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2013.07.003.

10. Горин О.З., Малых Т.К., Ковшаров А.Ф., Осодоев Ю.П. Современные особенности эпидемиологии клещевого энцефалита в Иркутской области. В кн.: Злобин В.И., редактор. Этиология, эпидемиология и диагностика инфекционных заболеваний Восточной Сибири. Иркутск; 1992. Р. 33–43.

11. Чумаченко И.Г., Логиновская А.А., Богомазова О.Л., Борисов В.А., Аитов К.А., Малов И.В., Данчинова Г.А., Козлова И.В. Изменения в структуре заболеваемости клещевым энцефалитом населения Иркутской области в 1993–2003 гг. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук – Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2004; 3(1):170–3.

12. Аитов К.А. К эпидемиологии клещевого энцефалита в Иркутской области. Журнал инфекционной патологии. 2018; 23(1-4):7–8.

13. Сидорова К.В., Петрова А.Г., Киклевич В.Т. Клинико-эпидемиологические аспекты клещевых риккетсиозов у детей Иркутской области за период с 2011 по 2014 год. Журнал инфекционной патологии. 2015; 7(3, приложение):79.

14. Любимцева О.А., Кашуба Э.А., Дроздова Т.Г., Огошкова Н.В., Бельтикова А.А., Чехова Ю.С., Антонова М.В., Лобацевич В.Ю., Рождественская Ю.В., Кремлева И.В., Токманцева Т.С. Опыт диагностики и лечения клещевого риккетсиоза в г. Тюмень. Журнал инфекционной патологии. 2015; 7(3, приложение):53.

15. Егембердиева Р.А., Есбауер С., Фрэй Ш., Дмитровский А.М., Турбеков Н.А., Шапилова Ж.Ж., Кырабаев К.К. Эпидемиологические признаки заболеваемости клещевым риккетсиозом в Кызылординской области Республики Казахстан. Национальные приоритеты России. 2014; 3:11–4.

16. Мерзлова Н.Б., Самаров М.Н. Природно-очаговые клещевые трансмиссивные инфекции у детей Пермского края (алгоритм дифференциальной диагностики). Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2012; 2:23–7.

17. Алексеев А.Н. Система клещей – возбудитель и ее эмергентные свойства. СПб.; 1993. 203 с.

18. Blasko-Markic M., Socan M. Tick-borne encephalitis in Slovenia: data from a questionnaire survey. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012; 12(6):496–502. DOI: 10.1089/vbz.2011.0871.

19. Боброва Л.В., Базилевская Т.Н. Клиника и течение болезни Лайма у детей города Красноярск. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1999; 1:13–5.

20. Зюзя Ю.Р., Ефимова Н.С., Воробьева Н.Н., Клишунцова Н.В., Гостева В.Я. Клинико-морфологические особенности проявлений мигрирующей эритемы у больных иксодовым клещевым боррелиозом. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1999; 4:36–41.

21. Леонова Г.Н., Иванис В.А., Дадалова О.Б., Дадалова О.Б., Мыльцина И.Н., Липовская О.И. Клинико-эпидемиологические аспекты иксодовых клещевых боррелиозов в Приморском крае. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2002; 1:49–53.

22. Pańczuk A., Kozioł-Montewka M., Tokarska-Rodak M. Exposure to ticks and seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* among a healthy young population living in the area of southern Podlasie, Poland. Ann. Agric. Environ. Med. 2014; 21(3):512–7. DOI: 10.5604/12321966.1120593.

23. Walter F., Ott J.J., Claus H., Krause G. Sex- and age patterns in incidence of infectious diseases in Germany: analyses of surveillance records over a 13-year period (2001–2013). Epidemiol. Infect. 2018; 146(3):372–8. DOI: 10.1017/S0950268817002771.

24. Cunze S., Glock G., Klimpel S. Spatial and temporal distribution patterns of tick-borne diseases (Tick-borne Encephalitis and Lyme Borreliosis) in Germany. PeerJ. 2021; 9:e12422. DOI: 10.7717/peerj.12422.

25. Chen X., Li F., Yin Q., Liu W., Fu S., He Y., Lei W., Xu S., Liang G., Wang S., Yang G., Qi X., Wang H. Epidemiology of tick-borne encephalitis in China, 2007–2018. PLoS One. 2019; 14(12):e0226712. DOI: 10.1371/journal.pone.0226712.

26. Ратникова Л.И., Шип С.А., Мисюкевич Н.Д., Стенько Е.А., Надеждин С.А., Предеина В.А., Иванова А.В., Пирогов Д.В. Клещевой энцефалит: клинико-эпидемиологическая характеристика по данным Челябинской области. В кн.: Материалы VIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. М.; 2016. С. 243.

27. Щучинова Л.Д., Щучинов Л.В., Ечешева А.В., Бондаренко Е.И. Эпидемиологические особенности сибирского клещевого тифа на высокоэндемичной территории Республики Алтай. В кн.: Попова А.Ю., редактор. Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения: Материалы XI съезда Всероссийского научно-практического Общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Москва, 16–17 ноября 2017 г. СПб.: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; 2017. С. 243.

28. Щучинова Л.Д. Влияние автомобилизации населения на заболеваемость клещевым энцефалитом в Республике Алтай. В кн.: Диагностика и профилактика инфекционных болезней: Материалы научно-практической конференции (Новосибирск, 26–28 сентября 2013 г.). Новосибирск: АРЕАЛ; 2013. С. 111.

29. Воронок В.М., Загней Е.В. Эпидемиологическая ситуация по клещевому энцефалиту в Приморском крае. В кн.: Итоги и перспективы изучения проблем инфекционных и паразитарных болезней: Сб. трудов конференции. Тюмень; 2015. Т. 1. С. 73–9.

30. Уфимцева А.Ю., Михалевский Д.А., Пеклеванная М.В. Демографическая ситуация в Иркутской области и Сибирском федеральном округе в 2009–2014 гг. Фундаментальные исследования. 2017; 1:223–7.

References

1. Platonov A.E., Avksent'ev N.A., Avksent'eva M.V., Derkach E.V., Platonova O.V., Titkov A.V., Kolyasnikova N.M. [Social and economic burden of five natural-focal infections in the Russian Federation]. Farmakoekonomika. Sovremennaya Farmakoekonomika i Farmakoepidemiologiya [Pharmacoeconomics. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology]. 2015; 8(1):47–56. DOI: 10.17749/2070-4909.2015.8.1.047-056.

2. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoilenko I.E., Yastrebov V.K., Obert A.S., Kurepina N.Yu. [Rickettsiae and Rickettsial Diseases of Spotted Fever Group in Siberia]. Omsk; 2012. 288 p.

3. Fel'dblyum I.V., Devyatkov M.Yu., Kas'yanenko E.V., Okuneva I.A. [Epidemiological effectiveness of acaricide treatments for tick-borne encephalitis]. Natsional'nye Prioritety Rossii [National Priorities of Russia]. 2011; 2:63–4.

4. Dmitrieva G.M., Salyamova L.V., Kostrykina T.V. [Experience in application of epidemiological surveillance system for tick-borne encephalitis in Krasnoyarsk Territory]. Natsional'nye Prioritety Rossii [National Priorities of Russia]. 2014; (3):63–5.

5. Skotareva M.A., Khisamiev I.I., Rozhkova E.V., Govorova V.G., Zubareva A.P., Umikamalova G.G. [Provision of epidemiological surveillance over tick-borne encephalitis in Republic of Bashkortostan]. Natsional'nye Prioritety Rossii [National Priorities of Russia]. 2021; (3):267–9.

6. Mel'nikova O.V., Andaev E.I., Nikitin A.Ya. [Some ecological, clinical and epidemiological characteristics of the tick-borne encephalitis in Irkutsk (1995–2015)]. Epidemiologiya i Vaksinooprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]. 2017; 16(2):56–62.

7. Mel'nikova O.V., Andaev E.I. [Epidemiological manifestations of Ixodid tick-borne borreliosis in Irkutsk and in other parts of the Eurasian area]. Epidemiologiya i Vaksinooprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]. 2019; 18(2):34–46. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-2-34-46.

8. Aitov K.A., Burdanova T.M., Lemeshevskaya M.V., Orlova L.S., Malov S.I., Makarova S.V., Leonenko V.V., Kotova I.V. [On the epidemiology of tick-borne rickettsiosis in Irkutsk Region]. Zhurnal Infektsionnoi Patologii [Journal of Infectious Pathology]. 2018; 23(1-4):8.

9. Zeman P., Benes C. Spatial distribution of a population at risk: an important factor for understanding the recent rise in tick-borne diseases (Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in the Czech Republic). *Ticks Tick Borne Dis.* 2013; 4(6):522–30. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2013.07.003.
10. Gorin O.Z., Malykh T.K., Kovsharov A.F., Osodoev Yu.P. [Modern peculiarities of the tick-borne encephalitis epidemiology in Irkutsk Region]. In: Zlobin V.I., editor. [Etiology, Epidemiology and Diagnosis of Infectious Diseases in Eastern Siberia]. Irkutsk; 1992. P. 33–43.
11. Chumachenko I.G., Loginovskaya A.A., Bogomazova O.L., Borisov V.A., Aitov K.A., Malov I.V., Danchinova G.A., Kozlova I.V. [The changes in tick-borne encephalitis morbidity structure of the Irkutsk Region population in 1993–2003]. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2004; 3(1):170–3.
12. Aitov K.A. [On the epidemiology of tick-borne encephalitis in Irkutsk Region]. *Zhurnal Infektsionnoi Patologii* [Journal of Infectious Pathology]. 2018; 23(1–4):7–8.
13. Sidorova K.V., Petrova A.G., Kiklevich V.T. [Clinical and epidemiological aspects of tick-borne rickettsiosis in children of the Irkutsk Region over the period of 2011–2014]. *Zhurnal Infektologii* [Journal of Infectology]. 2015; 7(3, supplement):79.
14. Lyubimtseva O.A., Kashuba E.A., Drozdova T.G., Ogoshkova N.V., Bel'tikova A.A., Chekhova Yu.S., Antonova M.V., Lobatsevich V.Yu., Rozhdestvenskaya Yu.V., Kremleva I.V., Tokmantseva T.S. [Experience in the diagnosis and treatment of tick-borne rickettsiosis in Tyumen]. *Zhurnal Infektologii* [Journal of Infectology]. 2015; 7(3, supplement):53.
15. Egemberdieva R.A., Essbauer S., Frey Sh., Dmitrovsky A.M., Turebekov N.A., Shapieva Zh.Zh., Kyraubaev K.K. [Epidemiological symptoms of tick-borne rickettsiosis in Kyzylorda Region of the Republic of Kazakhstan]. *Natsional'nye Prioritety Rossii* [National Priorities of Russia]. 2014; (3):11–4.
16. Merzlova N.B., Samarov M.N. Natural-focal tick-borne transmissible infections in children of Perm Region (differential diagnosis algorithm). *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni* [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]. 2012; (2):23–7.
17. Alekseev A.N. [Tick-Tick-Borne Pathogen System and its Emergent Qualities]. Saint Petersburg; 1993. 203 p.
18. Blasko-Markic M., Socan M. Tick-borne encephalitis in Slovenia: data from a questionnaire survey. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12(6):496–502. DOI: 10.1089/vbz.2011.0871.
19. Bobrova L.V., Bazilevskaya T.N. [Clinical presentation and the course of Lyme disease in children of Krasnoyarsk]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni* [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]. 1999; (1):13–5.
20. Zyuzya Yu.R., Efimova N.S., Vorob'eva N.N., Kltsunova N.V., Gosteva V.Ya. [Clinical and morphological features of the erythema migrans manifestations in patients with Ixodid tick-borne borreliosis]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni* [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]. 1999; (4):36–41.
21. Leonova G.N., Ivanis V.A., Dadalova O.B., Myl'tsina I.N., Lipovskaya O.I. [Clinical and epidemiological aspects of the Ixodid tick-borne borreliosis in Primorsk Territory]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni* [Epidemiology and Infectious Diseases]. 2002; (1):49–53.
22. Pańczuk A., Koziol-Montewka M., Tokarska-Rodak M. Exposure to ticks and seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* among a healthy young population living in the area of southern Podlasie, Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2014; 21(3):512–7. DOI: 10.5604/12321966.1120593.
23. Walter F., Ott J.J., Claus H., Krause G. Sex- and age patterns in incidence of infectious diseases in Germany: analyses of surveillance records over a 13-year period (2001–2013). *Epidemiol. Infect.* 2018; 146(3):372–8. DOI: 10.1017/S0950268817002771.
24. Cunze S., Glock G., Klimpel S. Spatial and temporal distribution patterns of tick-borne diseases (Tick-borne Encephalitis and Lyme Borreliosis) in Germany. *PeerJ.* 2021; 9:e12422. DOI: 10.7717/peerj.12422.
25. Chen X., Li F., Yin Q., Liu W., Fu S., He Y., Lei W., Xu S., Liang G., Wang S., Yang G., Qi X., Wang H. Epidemiology of tick-borne encephalitis in China, 2007–2018. *PLoS One.* 2019; 14(12):e0226712. DOI: 10.1371/journal.pone.0226712.
26. Ratnikova L.I., Ship S.A., Misyukevich N.D., Sten'ko E.A., Nadezhdin S.A., Predeina V.A., Ivanova A.V., Pirogov D.V. [Tick-borne encephalitis: clinical and epidemiological characteristics for Chelyabinsk region]. In: [Proceedings of the VIII Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases]. Moscow; 2016. P. 243.
27. Shchuchinova L.D., Shchuchinov L.V., Echesheva A.V., Bondarenko E.I. [Epidemiological features of Siberian tick-borne typhus on high-endemic territory of Altai Republic]. In: Popova A.Yu., editor. [Provision of Epidemiological Welfare: Challenges and Solutions: Proceedings of the XI Congress of All-Russian Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists. Moscow, November 16–17, 2017]. St. Petersburg; 2017. P. 243.
28. Shchuchinova L.D. [Effect of motorization of the population on the tick-borne encephalitis incidence in Altai Republic]. In: [Diagnosis and Prevention of Infectious Diseases: Proceedings of the Scientific and Practical Conference (Novosibirsk, September 26–28, 2013)]. Novosibirsk: "AREAL"; 2013. P. 111.
29. Voronok V.M., Zagney E.V. [Epidemiological situation on the tick-borne encephalitis in Primorsky Krai]. In: [Results and Prospects for Studies of Infectious and Parasitic Diseases]. Tyumen; 2015. Vol. 1. P. 73–8.
30. Ufimtseva A.Yu., Mikhalevsky D.A., Peklevannaya M.V. The demographic situation in the Irkutsk Region and Siberian Federal District in 2009–2014. *Fundamental'nye Issledovaniya* [Fundamental Research]. 2017; (1):223–7.

Authors:

Mel'nikova O.V., Andaev E.I. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Bykova N.A., Ustinova N.V. Center of Hygiene and Epidemiology in Irkutsk Region. 51, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: kc-zpp.irk@yandex.ru.

Об авторах:

Мельникова О.В., Андаев Е.И. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Быкова Н.А., Устинова Н.В. Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 51. E-mail: kc-zpp.irk@yandex.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-115-124

УДК 616.995.7:579.25(665.7)

Е.В. Найденова¹, К.С. Захаров¹, М.Ю. Карташов², Д.А. Агафонов¹, А.М. Сеничкина¹, А.Д. Катышев¹,
М.А. Diallo³, М.В. Bah³, S. Boumbaly^{3,4}, В.В. Кутырев¹**Выявление генетических маркеров возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней в пробах иксодовых клещей, собранных на территории Гвинейской Республики**¹ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;²ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Российская Федерация;³Исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика; ⁴Исследовательский центр вирусологии, Лаборатория вирусных геморрагических лихорадок Гвинеи, Конакри, Гвинейская Республика

В разные периоды в Западной Африке выявлена циркуляция достаточно широкого спектра возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней, передающихся клещами: боррелии, риккетсии, коксии, вирусы Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), Бханджа, синего языка овец Найроби и др. В настоящее время эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация по природно-очаговым инфекционным болезням, складывающаяся на территории Гвинейской Республики, выяснена не до конца. **Цель** работы – выявление генетических маркеров (РНК/ДНК) возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней в пробах иксодовых клещей, собранных в Гвинейской Республике, и определение спектра патогенов, циркулирующих на территории различных ландшафтно-географических зон страны. **Материалы и методы.** Для проведения исследований на территории всех ландшафтно-географических зон Гвинейской Республики были собраны 4695 экземпляров иксодовых клещей 11 видов. С учетом видовой принадлежности, пола, фазы развития, а также места сбора составлена панель из 1645 проб. Методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) проведена детекция генетических маркеров вирусов Крымской-Конго геморрагической лихорадки и клещевого энцефалита, а также *Borrelia burgdorferi* s.l., *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia muris*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) и *Francisella tularensis*. **Результаты и обсуждение.** В результате в суспензиях иксодовых клещей обнаружены: ДНК риккетсий группы КПЛ (25,6 % от всех исследуемых образцов), ДНК *C. burnetii* (6,2 %), кДНК *B. burgdorferi* s.l. (9,1 %) и РНК вируса ККГЛ (2,5 %). Перечисленный спектр возбудителей зарегистрирован во всех ландшафтно-географических зонах Гвинеи. Генетические маркеры возбудителей туляремии, анаплазмозов, эрлихиозов и клещевого энцефалита в настоящем исследовании не выявлены. Полученные результаты позволили уточнить возможный спектр болезней, передаваемых клещами, на территории Гвинейской Республики, определили необходимость дальнейшего изучения циркуляции возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней в Западной Африке и проведения регулярного эпизоотологического мониторинга.

Ключевые слова: иксодовые клещи, Гвинейская Республика, генетические маркеры, природно-очаговые инфекционные болезни, ПЦР, ОТ-ПЦР.

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

Для цитирования: Найденова Е.В., Захаров К.С., Карташов М.Ю., Агафонов Д.А., Сеничкина А.М., Катышев А.Д., Diallo М.А., Bah М.В., Boumbaly S., Кутырев В.В. Выявление генетических маркеров возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней в пробах иксодовых клещей, собранных на территории Гвинейской Республики. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:115–124. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-115-124

Поступила 26.10.2023. Принята к публ. 20.11.2023.

E.V. Naidenova¹, K.S. Zakharov¹, M.Yu. Kartashov², D.A. Agafonov¹, A.M. Senichkina¹,
A.D. Katsyhev¹, M.A. Diallo³, M.B. Bah³, S. Boumbaly^{3,4}, V.V. Kutyrev¹**Genetic Marker Detection of Natural-Focal Infectious Disease Pathogens in Samples of Ixodidae Ticks, Collected on the Territory of the Republic of Guinea**¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;²State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Russian Federation;³Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea;⁴Virology Research Center, Laboratory of Viral Hemorrhagic Fevers of Guinea, Conakry, Republic of Guinea

Abstract. The circulation of a rather wide range of pathogens of natural-focal infectious diseases transmitted by ticks was detected in West Africa at different points of time: *Borrelia*, *Rickettsia*, *Coxiella*, Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF), Bhanja, and bluetongue viruses, etc. Current epidemiological and epizootiological situation on natural-focal infectious diseases on the territory of the Republic of Guinea is not entirely clarified. **The aim** of this work was to identify genetic markers (RNA/DNA) of natural-focal infectious disease agents in samples of *Ixodidae* ticks collected in the Republic of Guinea, and to determine the spectrum of pathogens circulating in various landscape-geographical zones of the country. **Materials and methods.** To conduct research on the territory of all landscape-geographical zones of the Republic of Guinea, 4695 specimens of Ixodidae ticks of 11 species were collected. Taking into account the species appurtenance, gender, phase of development, as well as the site of collection, a panel of 1645 samples was compiled. Genetic markers of Crimean-Congo hemorrhagic fever and tick-borne encephalitis viruses, as well as *Borrelia burgdorferi* s.l., *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia muris*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* of the tick-borne spotted fever (TBSF) group, and *Francisella tularensis* were detected using polymerase chain reaction (PCR) and

reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results and discussion.** The following markers of natural-focal disease agents were found in the *Ixodidae* tick suspensions: DNA of Rickettsia of the TBSF group (25.6 % of all samples studied), DNA of *C. burnetii* (6.2 %), cDNA of *B. burgdorferi* s.l. (9.1 %), and RNA of the CCHF virus (2.5 %). The listed spectrum of pathogens has been registered in all landscape-geographical zones of Guinea. Genetic markers of tularemia, anaplasmosis, ehrlichiosis and tick-borne encephalitis pathogens have not been identified in this study. The results obtained made it possible to clarify the probable spectrum of tick-borne diseases in the territory of the Republic of Guinea, determined the need for further study of the circulation of natural-focal infectious disease agents in West Africa and conducting regular epizootiological monitoring.

Key words: Ixodidae ticks, Republic of Guinea, genetic markers, natural-focal infectious diseases, PCR, RT-PCR.

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

Funding: The studies were carried out within the framework of Orders of the Government of the Russian Federation dated December 22, 2017 No. 2904-r and November 14, 2020 No. 2985-r on Russian-Guinean scientific and technical cooperation in the field of epidemiology, prevention and monitoring of bacterial and viral infections in Guinea Republic.

Acknowledgements: The team of authors would like to express their gratitude to the staff of the Research Institute of Applied Biology of Guinea (Kindia, Republic of Guinea) and the Institute of Veterinary Medicine (Dalaba, Republic of Guinea) for their assistance in collecting samples of clinical and biological material.

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

Citation: Naidenova E.V., Zakharov K.S., Kartashov M.Yu., Agafonov D.A., Senichkina A.M., Katyshev A.D., Diallo M.A., Bah M.B., Boumbaly S., Kutyrev V.V. Genetic Marker Detection of Natural-Focal Infectious Disease Pathogens in Samples of Ixodidae Ticks, Collected on the Territory of the Republic of Guinea. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:115–124. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-115-124

Received 26.10.2023. Accepted 20.11.2023.

Naidenova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>
Zakharov K.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4726-309X>
Kartashov M.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>
Senichkina A.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1026-2680>
Katyshev A.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8260-4670>

Diallo M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4507-4575>
Bah M.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4565-269X>
Boumbaly S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4506-6033>
Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

В настоящее время природно-очаговые инфекционные болезни – актуальная проблема для здравоохранения многих стран мира, но особенно Африканского континента, где большая часть населения проживает в сельской местности и постоянно контактирует с природой. Основным вектором для передачи самого большого количества возбудителей инфекционных болезней человека традиционно считаются комары. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения, в 2023 г. в эндемичных регионах Африки зарегистрировано более 200 млн случаев заболевания малярией, десятки тысяч больных желтой лихорадкой, лихорадками денге, чикунгунья и Западного Нила [1]. Вторыми по эффективности, после комаров, переносчиками различных патогенов являются иксодовые клещи, которые четко привязаны к определенным территориям и способны длительное время сохранять возбудитель во внешней среде, передавая его трансвариально и транстадийно [2, 3].

Согласно литературным источникам, в странах Западной Африки в разное время выявлена циркуляция достаточно широкого спектра возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней, передающихся клещами: боррелии, риккетсии, коксиеллы, вирусы Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), Бханджа, синего языка овец Найроби и др. [3–9]. Так, в исследованиях ряда авторов указано, что 16,3 % всех острых лихорадочных заболеваний, зарегистрированных в сельских районах ряда западноафриканских стран, связаны с укусами клещей, но этиологическая расшифровка случаев практически не проводится [10].

В настоящее время эпидемиологическая и эпизоотическая ситуация по природно-очаговым ин-

фекционным болезням, складывающаяся на территории Гвинейской Республики, остается до конца неопределенной. Изучение распространения возбудителей этой группы патогенов началось в 80-е гг. прошлого столетия на базе Советско-Гвинейской научно-исследовательской вирусологической и микробиологической лаборатории. Во время работ, проведенных в те годы, впервые были получены данные о циркуляции многих арбовирусов, передаваемых клещами (ККГЛ, Дугбе, Бханджа и др.), а также различных видов риккетсий (в том числе и *Coxiella burnetii*, которая на тот момент относилась к представителям данной систематической группы) и боррелий [4, 11].

На современном этапе в рамках российско-гвинейского сотрудничества в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике исследования по данной тематике были продолжены.

Целью работы являлось выявление генетических маркеров (РНК/ДНК) возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней в пробах иксодовых клещей, собранных в Гвинейской Республике, и определение спектра патогенов, циркулирующих на территории различных ландшафтно-географических зон страны.

Материалы и методы

Исследования проводили на базе лаборатории Российско-Гвинейского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней, функционирующего на территории Института прикладной биологии Гвинеи в г. Киндия (Гвинейская Республика). Сбор иксодовых клещей осуществ-

вляли в 2017–2022 гг. на территории всех четырех ландшафтно-географических зон Гвинеи (рис. 1). Эктопаразитов снимали вручную, используя средства индивидуальной защиты, с людей, крупного и мелкого рогатого скота, домашних и бродячих собак и кошек, мелких млекопитающих, птиц, рептилий. Всего за время проведения исследований были собраны 4695 экземпляров иксодовых клещей 11 видов: *Amblyomma variegatum* Fabricius, 1794; *Haemaphysalis leachi* Audouin, 1826; *Hyalomma truncatum* Koch, 1844; *Hyalomma rufipes* Koch, 1844; *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* Koch, 1844; *Rhipicephalus (Boophilus) geigy* Aeschliman & Morel, 1965; *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* Say, 1821; *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1888; *Rhipicephalus lunulatus* Neumann, 1907; *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806; *Rhipicephalus senegalensis* Koch, 1844 [12], – из которых сформировано 1645 проб. Пулы комплектовали с учетом вида, пола, фазы развития и упитанности отдельных особей, а также места сбора в соответствии с МУ 3.1.3012-12, регламентирующими данный вид работы. Последующую подготовку к исследованию осуществляли в соответствии с МУ 1.3.2569-09 и

инструкциями фирм – производителей диагностических препаратов, используемых в данной работе.

Полученный и обработанный соответствующим образом биологический материал протестирован методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием наборов реагентов для выявления маркеров возбудителей: РНК вируса ККГЛ «АмплиСенс® ССНФV-FL»; кДНК вируса клещевого энцефалита, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Ehrlichia chaffeensis* / *Ehrlichia muris* и ДНК *Anaplasma phagocytophilum* «АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* / *E. muris*-FL»; ДНК *Coxiella burnetii* «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL», ДНК риккетсий группы КПЛ *Rickettsia* spp. «Набор реагентов АмплиСенс® *Rickettsia* spp. SFG-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия), а также ДНК *Francisella tularensis* «Ген *Francisella tularensis*-РГФ» (ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», Россия). Выделение нуклеиновых кислот проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп», реакцию обратной транскрипции – с набором «РЕВЕРТА-L» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия).

Am. variegatum,
Ha. leachi,
Hy. truncatum,
Rh. annulatus,
Rh. decoloratus,
Rh. geigy,
Rh. sanguineus,
Rh. senegalensis

Am. variegatum,
Hy. truncatum,
Rh. annulatus,
Rh. decoloratus,
Rh. geigy,
Rh. lunulatus,
Rh. sanguineus,
Rh. senegalensis

Am. variegatum,
Ha. leachi,
Hy. rufipes,
Hy. truncatum,
Rh. annulatus,
Rh. decoloratus,
Rh. geigy,
Rh. sanguineus,
Rh. senegalensis

Am. variegatum,
Hy. truncatum,
Rh. annulatus,
Rh. decoloratus,
Rh. geigy,
Rh. microplus,
Rh. senegalensis

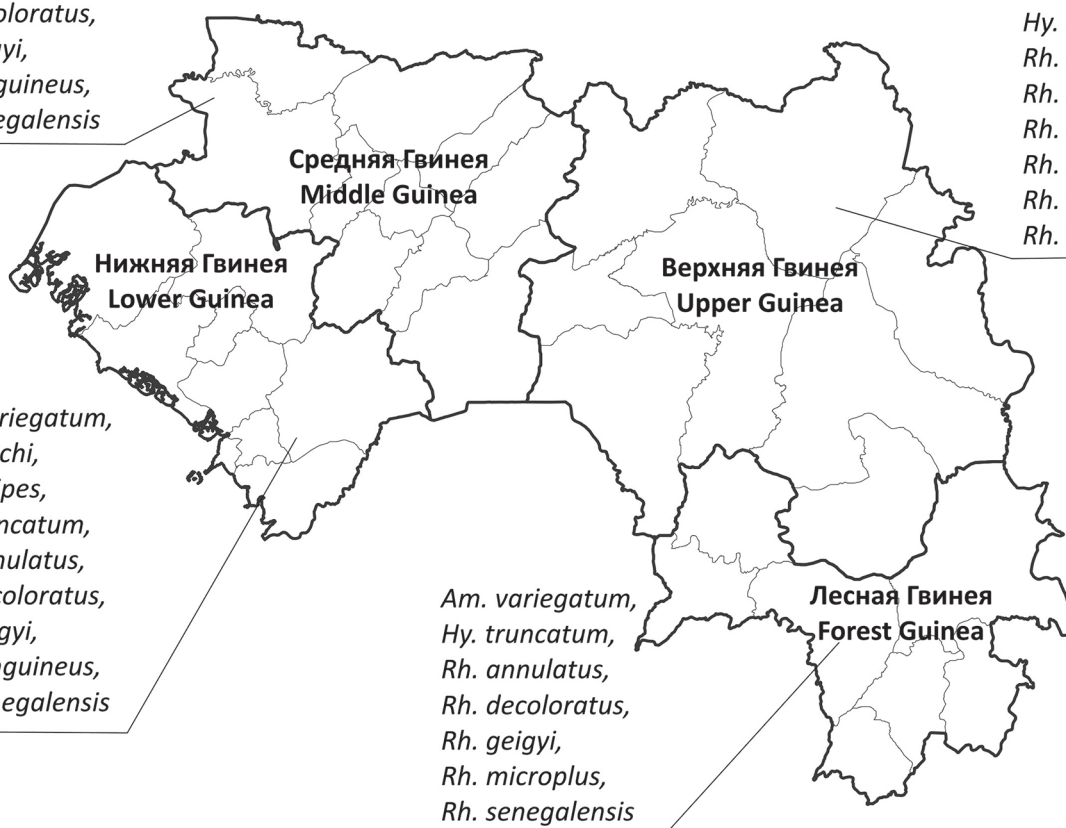


Рис. 1. Виды иксодовых клещей, собранных для исследования в различных ландшафтно-географических зонах Гвинейской Республики

Fig. 1. Species of Ixodidae ticks collected for research in various landscape-geographical zones of the Republic of Guinea

При статистической обработке материала рассчитывали долю выявленных маркеров возбудителей в каждой выборке, 95 % доверительные интервалы (ДИ) для долей по методу Уилсона. Для оценки уровня зараженности клещей использовали минимальный индекс инфицированности (МИИ) на 1000 эктопаразитов, который применяется при проведении исследований с объединенными пробами. Вычисляли МИИ по стандартной формуле: (количество положительных пулов / общее количество исследованных клещей) $\times$ 1000; а также 95 % доверительный интервал этих значений при помощи программного обеспечения PooledInfRate, версии 4.0 [13]. По всем выборкам применяли метод наибольшего правдоподобия с коррекцией искажений и 95 % ДИ с поправкой на асимметрию. Биоразнообразие видов эктопаразитов в различных ландшафтно-географических зонах Гвинейской Республики оценивали по нескольким показателям: индекс разнообразия Шеннона (H'), индекс выравненности Пиелу (E_H), индекс полидоминантности Симпсона (D), а также видовое богатство.

Результаты и обсуждение

Известно, что на территории Гвинейской Республики обитают представители более 30 видов иксодовых клещей, которые относятся к 7 родам [12, 14]. Пробы, представленные в настоящем исследовании, сформированы из эктопаразитов 11 видовых групп, в большинстве своем – *Am. variegatum* и *Rh. decoloratus*, которые являются самыми распространенными на территории Гвинейской Республики [12]. Интересным фактом в данной работе стало обнаружение в массовых сборах из Лесной Гвинеи клещей вида *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, впервые зарегистрированных на территории страны в 2021 г. [15] (рис. 1).

При оценке распространения отдельных видов переносчиков можно отметить, что наибольшее видовое богатство зарегистрировано в сборах

из Нижней и Лесной Гвинеи (10 и 9 видов соответственно). Также более высокими индексами разнообразия (H') и выравненности (E_H) характеризуются популяции клещей Верхней и Лесной Гвинеи, что может свидетельствовать о достаточно благоприятных и разнообразных условиях обитания на этих территориях. Показано, что индекс Симпсона (D) был выше для Нижней и Средней Гвинеи вследствие более выраженного доминирования *Am. variegatum* в этих ландшафтно-географических зонах. Табл. 1 и рис. 2 позволяют оценить биоразнообразие в популяциях иксодовых клещей всех четырех ландшафтно-географических зон Гвинейской Республики.

В настоящих исследованиях ДНК/РНК возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней выявлены в 715 (43,5 %) пробах, положительные результаты отмечались практически среди всех видов иксодовых клещей, представленных в работе, но большинство относились к *Am. variegatum*, *Rh. geigy*, *Rh. annulatus*.

Выявление РНК вируса ККГЛ. Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) – природно-очаговая инфекционная болезнь, широко распространенная в странах Африки, Азии и Европы [16, 17]. Возбудителем инфекции является вирус ККГЛ, который относится к семейству *Nairoviridae* порядку *Bunyavirales*. Резервуарами и переносчиками вируса считаются около 30 видов иксодовых клещей, относящихся к родам: *Hyalomma*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Boophilus* и *Amblyomma* [18]. Для большинства стран Западной Африки заболевание эндемично. На территории Гвинейской Республики в начале 80-х гг. прошлого столетия проводились работы по выявлению циркуляции вируса ККГЛ, которые продолжены в настоящее время [4, 9].

Ранее авторами была проведена актуализация данных о циркуляции возбудителя КГЛ в Гвинее на современном этапе, вирусная РНК обнаружена в 1,3 % случаев [9, 19]. С появлением возможности увеличения количества экспедиционных выездов,

Таблица 1 / Table 1

Оценка биологического разнообразия в популяциях иксодовых клещей, собранных на территории Гвинейской Республики

Assessment of biological diversity in populations of Ixodidae ticks collected in the territory of the Republic of Guinea

Ландшафтно-географическая зона Landscape-geographical zone	Количество экземпляров собранных клещей Number of specimens of collected ticks	Доля в выборке, % Share in the sample, %	Индекс разнообразия Шеннона Shannon Diversity Index (H')	Индекс выравненности Пиелу Pielu Equalization Index (E_H)	Индекс полидоминантности Симпсона Simpson's Diversity Index (D)	Видовое богатство Species abundance
Нижняя Гвинея Lower Guinea	1828	38,8	1,203	0,522	0,431	10
Средняя Гвинея Central Guinea	795	16,9	1,020	0,569	0,455	06
Верхняя Гвинея Upper Guinea	679	14,4	1,427	0,796	0,271	06
Лесная Гвинея Forest Guinea	1407	29,9	1,444	0,657	0,307	09

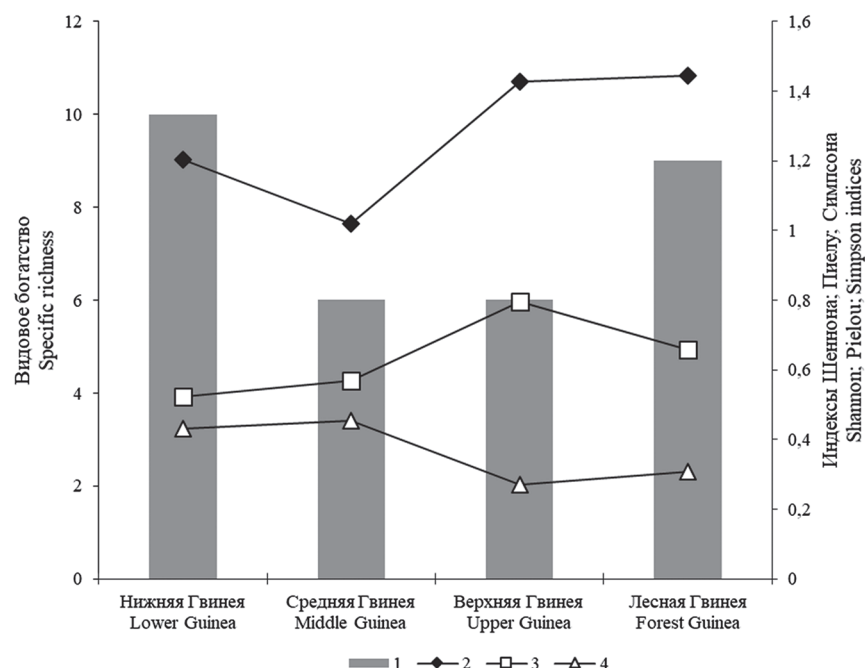


Рис. 2. Показатели видового разнообразия в популяциях иксодовых клещей, собранных на территории Гвинейской Республики:

1 – видовое богатство; 2 – индекс Шеннона; 3 – индекс Пиелу; 4 – индекс Симпсона

Fig. 2. Indicators of species diversity in populations of *Ixodidae* ticks collected on the territory of the Republic of Guinea:

1 – species richness; 2 – Shannon's index; 3 – Pielou index; 4 – Simpson's index

расширением границ обследуемых территорий и, соответственно, большими объемами сборов исследуемого материала получены новые данные, и по итогам настоящего исследования положительные результаты зарегистрированы в 41 пробе, что составило 2,5 % от общего количества. Потенциальными переносчиками вируса ККГЛ могут являться 5 видов клещей из 9 изученных: *Am. variegatum*, *Rh. decoloratus*, *Rh. geigy*, *Rh. annulatus*, *Rh. sanguineus* (табл. 2). Общая зараженность проб, представленных в данном исследовании, возбудителем КГЛ составила 8,8/1000.

Выявление РНК вируса клещевого энцефалита.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), относящийся к семейству *Flaviviridae*, широко распространен в ряде европейских и азиатских стран. На территории Африканского континента сведений о выявлении маркеров ВКЭ в настоящее время нет. Данный раздел работы изначально не входил в планы исследований и был выполнен с использованием набора реагентов для выявления возбудителей инфекционных болезней, передающихся клещами, в состав реакционных смесей которого входят и специфические праймеры для детекции РНК ВКЭ. При проведении тестирования во всех пробах получен отрицательный результат.

Выявление ДНК риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ). Риккетсиозы, вызываемые бактериями рода *Rickettsia*, принадлежащими к группе КПЛ, считаются одними из старейших известных трансмиссивных зоонозных заболеваний [20] и второй, после малярии, причиной лихорадочных состояний у путешественников, возвращающихся из стран Африки [21].

Наиболее распространенным представителем данной систематической группы на всем континенте, в том числе и в западноафриканских странах, является *Rickettsia africae*, этиологический агент афри-

канской клещевой лихорадки [22]. Также на территории Африки широко распространена *R. massiliae*, которая была обнаружена в клещах *Rh. muhsamae*, *Rh. lunulatus* и *Rh. sulcatus* в Центральноафриканской Республике [23] и в клещах *Rh. muhsamae*, собранных с сельскохозяйственных животных на территории Мали [24]. В Нигере, Мали и Зимбабве регистрируется циркуляция *R. aeschlimannii* [25]. В некоторых регионах Сенегала были доказаны случаи заболевания людей, вызванные *R. felis*, а также первый случай выявления в Западной Африке *R. conorii* в материале от клещей рода *Rhipicephalus* [26].

В настоящей работе ДНК риккетсий группы КПЛ обнаружена в 422 образцах, что составило 29,7 % от общего количества проб. Положительные находки зарегистрированы во всех видовых группах эктопаразитов, подготовленных для работы (табл. 3). Общая зараженность риккетсиями группы КПЛ составила 98,9/1000. В перспективе планируется уточнение видов данных возбудителей, циркулирующих на территории Гвинейской Республики.

Выявление ДНК возбудителя анаплазмоза.

Рядом авторов было показано, что на территории Африки широко распространены и представители рода *Anaplasma* (сем. *Ehrlichia*) – *A. platys* и *A. phagocytophilum*, патогенные как для человека, так и для домашних животных [27]. В африканских странах к югу от Сахары *A. phagocytophilum* была идентифицирована у овец в Сенегале [28], а также у диких животных в Зимбабве и Южной Африке [29]. Среди домашнего скота наиболее широкое распространение имеет *A. marginale* [30].

Но по данным нашего исследования, в образцах, взятых в работу, генетические маркеры возбудителя анаплазмоза не обнаружены.

Выявление РНК возбудителя боррелиоза. По данным зарубежных авторов, на территории неко-

Таблица 2 / Table 2

Результаты выявления генетических маркеров возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней в пробах иксодовых клещей на территории Гвинеи

Results of identification of genetic markers of natural-focal infectious disease pathogens in samples of Ixodidae ticks obtained on the territory of the Republic of Guinea

Виды клещей Species of ticks	Количество проб (экземпляров) Number of samples (specimens)	Выявление генетических маркеров (ДНК/РНК) различных видов патогенов, %; (ДИ) Identification of genetic markers (DNA/RNA) of various types of pathogens; %, (CI)								
		Вирус ККГП CCHF virus	Вирус КЭ TBEV	Риккетсии группы КПП <i>Rickettsia</i> of TBSF group	<i>An. phagocytophilum</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i>	<i>F. tularensis</i>	<i>C. burnetii</i>	Общее количество положительных проб Total number of positive samples
<i>Am. variegatum</i>	872 (2493)	23; 2,6; (1,8–3,9)	0	271; 31,1; (28,1–34,2)	0	81; 9,3; (7,5–11,4)	0	0	77; 8,8; (7,1–10,9)	452; 51,8; (48,5–55,1)
<i>Ha. leachi</i>	16 (56)	0	0	2; 12,5; (3,5–36,1)	0	2; 12,5; (3,5–36,1)	0	0	0	4; 25,0; (10,2–49,5)
<i>Hy. rufipes</i>	1 (3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hy. truncatum</i>	52 (95)	0	0	8; 15,4; (8,1–27,5)	0	3; 5,8; (1,9–15,6)	0	0	0	11; 21,2; (12,2–34,1)
<i>Rh. annulatus</i>	58 (161)	4; 6,9; (2,7–16,4)	0	14; 24,1; (14,9–36,5)	0	18; 31,1; (20,6–43,8)	0	0	3; 5,2; (1,8–14,1)	39; 67,2; (54,4–77,9)
<i>Rh. decoloratus</i>	391 (1104)	4; 1,0; (0,4–2,6)	0	72; 18,4; (14,9–22,6)	0	29; 7,4; (5,2–10,4)	0	0	13; 3,3; (1,9–5,6)	118; 30,2; (25,8–34,9)
<i>Rh. geigyi</i>	210 (668)	9; 4,3; (2,3–7,9)	0	52; 24,8; (19,4–31,1)	0	17; 8,1; (5,1–12,6)	0	0	9; 4,3; (2,3–7,9)	87; 41,4; (34,9–48,2)
<i>Rh. lunulatus</i>	2 (11)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rh. microplus</i>	18 (47)	0	0	1; 5,5; (1,0–25,6)	0	0	0	0	0	1; 5,5; (1,0–25,6)
<i>Rh. sanguineus</i>	10 (42)	1; 10; (1,8–40,4)	0	1; 10; (1,8–40,4)	0	0	0	0	0	2; 20; (5,7–50,9)
<i>Rh. senegalensis</i>	18 (29)	0	0	1; 5,6; (0,9–25,7)	0	0	0	0	0	1; 5,6; (0,9–25,7)
Итого Total	1648 (4709)	41; 2,5; (1,8–3,7)	0	422; 25,6; (23,6–27,8)	0	150; 9,1; (7,8–10,6)	0	0	102; 6,2; (5,1–7,5)	715; 43,5; (41,1–45,9)

Таблица 3 / Table 3

Выявление генетических маркеров природно-очаговых инфекционных болезней в различных видах иксодовых клещей, собранных на территории Гвинейской Республики
Detection of genetic markers of natural focal infectious diseases in various species of Ixodidae ticks collected on the territory of the Republic of Guinea

Вид выявленного патогена Type of pathogen detected	Вид клещей Species of ticks	МИИ на 1000 клещей для каждого вида Minimum infection index per 1000 ticks of each species	95 % ДИ 95 % CI	Общий для возбудителя МИИ (95 % ДИ) Common for pathogen Minimum infection index per 1000 ticks (95 % CI)
Вирус ККГЛ CCHF virus	<i>Am. variegatum</i>	9,3	(6,1–13,7)	8,8 (6,4–11,8)
	<i>Rh. annulatus</i>	25,2	(8,3–59,2)	
	<i>Rh. decoloratus</i>	3,6	(1,2–8,7)	
	<i>Rh. geigy</i>	13,7	(6,7–24,9)	
	<i>Rh. sanguineus</i>	22,8	(1,4–104,9)	
Риккетсии группы КПП <i>Rickettsia</i> of TBSF group	<i>Am. variegatum</i>	122,8	(110,0–136,6)	98,9 (90,3–107,9)
	<i>Ha. leachi</i>	36,0	(6,7–112,9)	
	<i>Hy. truncatum</i>	87,1	(41,8–158,4)	
	<i>Rh. annulatus</i>	93,2	(54,7–147,6)	
	<i>Rh. decoloratus</i>	69,6	(55,5–86,2)	
	<i>Rh. geigy</i>	86,0	(65,7–110,4)	
	<i>Rh. microplus</i>	21,1	(1,2–97,7)	
	<i>Rh. sanguineus</i>	24,3	(1,4–116,8)	
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>Am. variegatum</i>	33,3	(26,8–40,9)	32,8 (27,9–38,2)
	<i>Ha. leachi</i>	37,8	(6,8–122,1)	
	<i>Hy. truncatum</i>	31,4	(8,4–81,9)	
	<i>Rh. annulatus</i>	124,6	(78,6–186,4)	
	<i>Rh. decoloratus</i>	26,9	(18,5–37,8)	
	<i>Rh. geigy</i>	26,2	(15,9–40,8)	
<i>C. burnetii</i>	<i>Am. variegatum</i>	31,9	(25,5–39,5)	22,1 (18,2–26,7)
	<i>Rh. annulatus</i>	18,9	(5,0–50,2)	
	<i>Rh. decoloratus</i>	11,8	(6,6–19,6)	
	<i>Rh. geigy</i>	13,6	(6,7–24,8)	

торых стран Западной Африки в пробах от клещей были выявлены маркеры (ДНК или антиген) разных представителей рода *Borrelia*. Большинство публикаций посвящено определению и типированию *Borrelia crocidurae* в пробах аргасовых клещей рода *Ornithodoros* [31]. В то же время известно, что иксодовые клещи также являются активными переносчиками возбудителей боррелиозов, и очевидна необходимость изучения эктопаразитов и данной систематической группы.

При исследовании суспензий клещей из различных ландшафтно-географических зон Гвинейской Республики с целью выявления генетических маркеров возбудителей боррелиозов, положительные результаты получены в 150 (10 %) суспензиях клещей видов *Am. variegatum*, *Ha. leachi*, *Hy. truncatum*, *Rh. geigy*, *Rh. annulatus*, *Rh. decoloratus*. Общая зараженность в данном случае составила 32,8/1000.

Выявление ДНК возбудителя туляремии. Туляремия – особо опасная природно-очаговая инфекционная болезнь человека и животных, возбу-

дителем которой является *Francisella tularensis* (сем. *Francisellaceae*). Передача патогена происходит в основном при контакте с дикими грызунами и употреблении загрязненной питьевой воды, а также через укусы кровососущих членистоногих [32].

Четких данных о выявлении ДНК возбудителя туляремии на Африканском континенте нет. Имеются лишь единичные публикации об исследованиях по детекции *F. tularensis* и *Francisella* spp. в клещах родов *Hyalomma* и *Amblyomma* методом ПЦР, добытых на территориях Северной и Восточной Африки [33, 34], где в качестве ДНК-мишени авторы использовали гены *16S* рРНК, *sdhA* и *tul4*. Выявлены *16S* рРНК *Francisella* spp. и *Francisella*-подобные эндосимбионты в пробах клещей рода *Hyalomma*. Сведений по выявлению возбудителя туляремии на территории Западной Африки в литературных источниках найти не удалось [35].

В наших исследованиях ДНК *F. tularensis* в пробах иксодовых клещей методом ПЦР не обнаружена, но однозначные выводы делать пока рано.

Необходимо проведение дальнейшего регулярного эпизоотологического мониторинга.

Выявление ДНК возбудителя лихорадки Ку. Коксиеллез (лихорадка Ку, Q fever) – природно-очаговая болезнь, общая для человека и животных, возбудителем которой являются бактерии вида *Coxiella burnetii* (сем. *Coxiellaceae*). В природных очагах резервуаром возбудителя являются иксодовые и аргасовые клещи, дикие мелкие млекопитающие и сельскохозяйственные животные. В связи с широким распространением инфекции, многообразием путей передачи (контактный, пищевой, воздушно-пылевой) лихорадка Ку представляет важную медико-социальную проблему во всем мире [36].

Современные данные о заболеваемости лихорадкой Ку и распространении *C. burnetii* на территории Африки являются ограниченными и неоднородными [37]. В результате работы, выполненной в 1980-х гг., впервые на территории Гвинейской Республики установлено присутствие возбудителя лихорадки Ку во всех ландшафтно-географических зонах, но достоверных сведений об особенностях циркуляции возбудителя и основных его переносчиках получено не было [11].

В настоящем исследовании генетические маркеры *C. burnetii* выявлены в 102 (6,2 %) суспензиях клещей видов *Am. variegatum*, *Rh. geigy*, *Rh. annulatus*, *Rh. decoloratus*, таким образом, общая зараженность клещей возбудителем лихорадки Ку составила 22,1/1000.

Для проведения последующего генетического типирования была создана панель из 20 образцов, представленных разными видами клещей, в которых обнаружена ДНК *C. burnetii*. Методом ПЦР со специфическими праймерами к локусам плазмид QpH1, QpRS и QpDV в 5 образцах выявлено наличие только QpH1. В ходе анализа полученных результатов и данных литературы установлено, что штаммы, несущие плазмиду QpH1, широко распространены на территории стран Экваториальной Африки и способны вызывать заболевания у людей и животных [38]. Также сформированная панель генетических образцов *C. burnetii* проанализирована с использованием высокопроизводительного секвенирования на платформе Ion S5 (Thermo Scientific, США). В результате работы в 8 пробах определена нуклеотидная последовательность 16S рРНК возбудителя лихорадки Ку, которая на 99,9 % совпадает с референсным штаммом, представленным в базе данных NCBI GenBank. Каких-либо полиморфизмов, связанных с географическим происхождением образцов и видами переносчика, не выявлено. Полученные нуклеотидные последовательности 16S рРНК с наиболее качественным прочтением депонированы в международную базу данных (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) под номерами OQ152497 – OQ152500.

Также в некоторых пробах выявлено одновременное присутствие генетических маркеров сразу нескольких видов возбудителей: РНК вируса ККГЛ +

ДНК *C. burnetii* – в 3 (0,2 %) случаях, ДНК риккетсий группы КПЛ + кДНК *B. burgdorferi s.l.* – в 18 (1,1 %).

Таким образом, в результате проведенной работы в суспензиях иксодовых клещей, собранных на территории Гвинейской Республики, обнаружены ДНК риккетсий группы КПЛ (25,6 % от всех исследуемых образцов), ДНК *C. burnetii* (6,2 %), кДНК *B. burgdorferi s.l.* (9,1 %) и РНК вируса ККГЛ (2,5 %). Перечисленный спектр возбудителей зарегистрирован во всех ландшафтно-географических зонах Гвинеи. Генетические маркеры возбудителей туляремии, анаплазмозов, эрлихиозов и клещевого энцефалита в настоящем исследовании не выявлены.

Полученные результаты позволили уточнить возможный спектр заболеваний, передаваемых клещами, на территории Гвинейской Республики, определили необходимость дальнейшего изучения циркуляции возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней в Западной Африке и проведения регулярного эпизоотологического мониторинга.

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

Финансирование. Исследования проводились в рамках распоряжений Правительства Российской Федерации от 22 декабря 2017 г. № 2904-р и от 14 ноября 2020 г. № 2985-р о российско-гвинейском научно-техническом сотрудничестве в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике.

Благодарность. Авторский коллектив выражает свою благодарность за помощь в сборе образцов клинического и биологического материала сотрудникам Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи (Киндиа, Гвинейская Республика) и Института медицинской ветеринарии (Далаба, Гвинейская Республика).

Список литературы

1. WHO. Promising progress on neglected tropical diseases in Africa. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.afro.who.int/news/promising-progress-neglected-tropical-diseases-africa> (дата обращения 18.10.2023).
2. van Vuuren M., Penzhorn B.L. Geographic range of vector-borne infections and their vectors: the role of African wildlife. *Rev. Sci. Tech.* 2015; 34(1):139–49. DOI: 10.20506/rst.34.1.2350.
3. Ehounoud C.B., Fenollar F., Dahmani M., N'Guessan J.D., Raoult D., Mediannikov O. Bacterial arthropod-borne diseases in West Africa. *Acta Trop.* 2017; 171:124–37. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.03.029.
4. Бутенко А.М. Изучение циркуляции арбовирусов в Гвинейской Республике. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни.* 1996; 2:40–5.
5. Карташов М.Ю., Гладышева А.В., Найденова Е.В., Захаров К.С., Швалов А.Н., Кривошеина Е.И., Сеничкина А.М., Ба М.Б., Терновой В.А., Бумбали С., Локтев В.Б. Молекулярно-генетическая характеристика многокомпонентного флавивирусового вируса Kindia tick virus (Flaviviridae), обнаруженного в иксодовых клещах на территории Гвинейской Республики. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(6):487–95. DOI: 10.36233/0507-4088-145.
6. Ehounoud C.B., Yao K.P., Dahmani M., Achi Y.L., Amanzougaghene N., Kacou N'Douba A., N'Guessan J.D., Raoult D., Fenollar F., Mediannikov O. Multiple pathogens including potential new species in tick vectors in Côte d'Ivoire. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(1):e0004367. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004367.

7. Mediannikov O., Diatta G., Fenollar F., Sokhna C., Trape J.-F., Raoult D. Tick-borne rickettsioses, neglected emerging diseases in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(9):e821. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000821.
8. Mediannikov O., Fenollar F., Socolovschi C., Diatta G., Bassene H., Molez J.-F., Sokhna C., Trape J.-F., Raoult D. *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(4):e654. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000654.
9. Naidenova E.V., Zakharov K.S., Kartashov M.Y., Agafonov D.A., Senichkina A.M., Magassouba N.F., Nouridine I., Nassour A.A., Bah M.B., Kourouma A., Boumbali S., Boiro M.Y., Scherbakova S.A., Kutuyev V.V., Dedkov V.G. Prevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in rural areas of Guinea. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(5):101475. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2020.101475.
10. Cazorla C., Socolovschi C., Jensenius M., Parola P. Tick-borne diseases: tick-borne spotted fever rickettsioses in Africa. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2008; 22(3):531–44. DOI: 10.1016/j.idc.2008.03.009.
11. Каливоги С., Буаро М.Е., Константинов О.К., Плотникова Л.Ф. Имунная структура населения и домашних животных Гвинейской Республики в отношении риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки и лихорадки Ку. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни.* 2013; 1:28–30.
12. Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.-L., Estrada-Peña A., Horak I.G., Latif A.A., Pegram R.G., Preston P.M. Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species. Edinburgh: Bioscience Reports; 2014. 227 p.
13. Biggerstaff B. PooledInfRate, Version 4.0: An Excel® Add-In to Compute Infection Rates from Pooled Data. Centers for Disease Control and Prevention Fort Collins: Colorado. 2016. [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/CDCgov/PooledInfRate> (дата обращения 10.10.2023).
14. Konstantinov O.K. Les tiques de la famille Ixodidae comme réservoir d'arbovirus en République de Guinée. II. Les arbovirus. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 1990; 43(1):15–22. DOI: 10.19182/remvt.8883.
15. Makenov M.T., Toure A.H., Korneev M.G., Sacko N., Porshakov A.M., Yakovlev S.A., Radyuk E.V., Zakharov K.S., Shipovalov A.V., Boumbaly S., Zhurenkova O.B., Grigoreva Y.E., Morozkin E.S., Fyodorova M.V., Boiro M.Y., Karan L.S. Rhipicephalus microplus and its vector-borne haemoparasites in Guinea: further species expansion in West Africa. *Parasitol. Res.* 2021; 120(5):1563–70. DOI: 10.1007/s00436-021-07122-x.
16. Бутенко А.М., Трусова И.Н. Заболеваемость Крымской геморрагической лихорадкой в странах Европы, Африки и Азии (1943–2012 гг.). *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2013; 5:46–8.
17. O'Hearn A.E., Voorhees M.A., Fetterer D.P., Wauquier N., Coomber M.R., Bangura J., Fair J.N., Gonzalez J.-P., Schoepp R.J. Serosurveillance of viral pathogens circulating in West Africa. *Virol. J.* 2016; 13(1):163. DOI: 10.1186/s12985-016-0621-4.
18. Papa A., Mirazimi A., Köksal I., Estrada-Pena A., Feldmann H. Recent advances in research on Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J. Clin. Virol.* 2015; 64:137–43. DOI: 10.1016/j.jcv.2014.08.029.
19. Найденова Е.В., Захаров К.С., Карташов М.Ю., Агафонов Д.А., Бойко А.В., Касьян Ж.А., Сеничкина А.М., Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Шиповалов А.В., Дубинина А.А., Поршаков А.М., Nouridine I., Diallo M.G., Nassour A.A., Kourouma A., Drame F., Сафронов В.А., Лопатин А.А., Boumbali S., Kalivogui S., Boiro M.Y., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Выявление маркеров вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки в пробах иксодовых клещей, собранных на территории Гвинейской Республики. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 2:93–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-93-98.
20. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е. Риккетсии и риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2017; 2:43–8.
21. Jensenius M., Davis X., von Sonnenburg F., Schwartz E., Keystone J.S., Leder K., Lopéz-Vélaz R., Caumes E., Cramer J.P., Chen L., Parola P.; GeoSentinel Surveillance Network. Multicenter GeoSentinel analysis of rickettsial diseases in international travelers, 1996–2008. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(11):1791–8. DOI: 10.3201/eid1511.090677.
22. Tawana M., Onyiche T.E., Ramatla T., Mtshali S., Thekisoe O. Epidemiology of ticks and tick-borne pathogens in domestic ruminants across Southern African Development Community (SADC) Region from 1980 until 2021: A systematic review and meta-analysis. *Pathogens.* 2022; 11(8):929. DOI: 10.3390/pathogens11080929.
23. Dupont H.T., Cornet J.P., Raoult D. Identification of rickettsiae from ticks collected in the Central African Republic using the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 50(3):373–80. DOI: 10.4269/ajtmh.1994.50.373.
24. Parola P., Inokuma H., Camicas J.L., Brouqui P., Raoult D. Detection and identification of spotted fever group *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in African ticks. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7(6):1014–7. DOI: 10.3201/eid0706.010616.
25. Parola P., Paddock C.D., Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(4):719–56. DOI: 10.1128/CMR.18.4.719-756.2005.
26. Mediannikov O., Diatta G., Fenollar F., Sokhna C., Trape J.-F., Raoult D. Tick-borne rickettsioses, neglected emerging diseases in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(9):e821. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000821.
27. Pérez-Tanoira R., Ramos-Rincón J.M., Martín-Martín I., Prieto-Pérez L., Tefasmaria A., Tiziano G., Anda P., González-Martín-Niño R.M., Rodríguez-Vargas M., Górgolas M., Jado I. Molecular survey of *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp., and *Borrelia* spp. in fleas and lice in Ethiopia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2020; 20(1):10–4. DOI: 10.1089/vbz.2019.2500.
28. Djiba M.L., Mediannikov O., Mbengue M., Thiongane Y., Molez J.-F., Seck M.T., Fenollar F., Raoult D., Ndiaye M. Survey of *Anaplasmataceae* bacteria in sheep from Senegal. *Trop. Anim. Health Prod.* 2013; 45(7):1557–61. DOI: 10.1007/s11250-013-0399-y.
29. Nakayima J., Hayashida K., Nakao R., Ishii A., Ogawa H., Nakamura I., Moonga L., Hang'ombe B.M., Mweene A.S., Thomas Y., Orba Y., Sawa H., Sugimoto C. Detection and characterization of zoonotic pathogens of free-ranging non-human primates from Zambia. *Parasit. Vectors.* 2014; 7:490. DOI: 10.1186/s13071-014-0490-x.
30. M'ghirbi Y., Bèji M., Oporto B., Khrouf F., Hurtado A., Bouattour A. *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in cattle in Tunisia. *Parasit. Vectors.* 2016; 9(1):556. DOI: 10.1186/s13071-016-1840-7.
31. Trape J.F., Duplantier J.M., Bouganali H., Godeluck B., Legros F., Cornet J.P., Camicas J.L. Tick-borne borreliosis in West Africa. *Lancet.* 1991; 337(8739):473–5. DOI: 10.1016/0140-6736(91)93404-w.
32. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: Практическое руководство. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Буква; 2014. 284 с.
33. Ghoneim N.H., Abdel-Moein K.A., Zaher H.M. Molecular detection of *Francisella* spp. among ticks attached to camels in Egypt. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017; 17(6):384–7. DOI: 10.1089/vbz.2016.2100.
34. Szigeti A., Kreizinger Z., Hornok S., Abichu G., Gyuranecz M. Detection of *Francisella*-like endosymbiont in *Hyalomma rufipes* from Ethiopia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5(6):818–20. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.06.002.
35. Mohamed S.E.R., Mubarak A.I., Alfarooq L.O. *Francisella tularensis* bacteremia: a case report from Sudan. *Case Rep. Infect. Dis.* 2012; 2012:405737. DOI: 10.1155/2012/405737.
36. Maurin M., Raoult D. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12(4):518–53. DOI: 10.1128/CMR.12.4.518.
37. Vanderburg S., Rubach M.P., Halliday J.E., Cleaveland S., Reddy E.A., Crump J.A. Epidemiology of *Coxiella burnetii* infection in Africa: a One Health systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(4):e2787. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002787.
38. Панферова Ю.А. Молекулярные основы патогенности *Coxiella burnetii*. *Инфекция и иммунитет.* 2016; 6(1):7–24. DOI: 10.15789/2220-7619-2016-1-7-24.

References

1. WHO. Promising progress on neglected tropical diseases in Africa. (Cited 18 Oct 2023). [Internet]. Available from: <https://www.afro.who.int/news/promising-progress-neglected-tropical-diseases-africa>.
2. van Vuuren M., Penzhorn B.L. Geographic range of vector-borne infections and their vectors: the role of African wildlife. *Rev. Sci. Tech.* 2015; 34(1):139–49. DOI: 10.20506/rst.34.1.2350.
3. Ehounoud C.B., Fenollar F., Dahmani M., N'Guessan J.D., Raoult D., Mediannikov O. Bacterial arthropod-borne diseases in West Africa. *Acta Trop.* 2017; 171:124–37. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.03.029.
4. Butenko A.M. [Study of arbovirus circulation in the Republic of Guinea]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 1996; (2):40–5.
5. Kartashov M.Yu., Gladysheva A.V., Naidenova E.V., Zakharov K.S., Krivosheina E.I., Shvalov A.N., Senichkina A.M., Bah M.B., Ternovoi V.A., Boumbaly S., Loktev V.B. [Molecular and genetic characteristics of the multicomponent flavivirus-like Kindia tick virus (Flaviviridae) found in ixodid ticks on the territory of the Republic of Guinea]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2022; 67(6):487–95. DOI: 10.36233/0507-4088-145.
6. Ehounoud C.B., Yao K.P., Dahmani M., Achi Y.L., Amanzougaghene N., Kacou N'Douba A., N'Guessan J.D., Raoult D., Fenollar F., Mediannikov O. Multiple pathogens including potential new species in tick vectors in Côte d'Ivoire. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(1):e0004367. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004367.
7. Mediannikov O., Diatta G., Fenollar F., Sokhna C., Trape J.-F., Raoult D. Tick-borne rickettsioses, neglected emerging di-

- seases in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(9):e821. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000821.
8. Mediannikov O., Fenollar F., Socolovschi C., Diatta G., Bassene H., Molez J.-F., Sokhna Ch., Trape J.-F., Raoult D. *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(4):e654. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000654.
9. Naidenova E.V., Zakharov K.S., Kartashov M.Y., Agafonov D.A., Senichkina A.M., Magassouba N.F., Nouridine I., Nassour A.A., Bah M.B., Kourouma A., Boumbali S., Boiro M.Y., Scherbakova S.A., Kuttyrev V.V., Dedkov V.G. Prevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in rural areas of Guinea. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(5):101475. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2020.101475.
10. Cazorla C., Socolovschi C., Jensenius M., Parola P. Tick-borne diseases: tick-borne spotted fever rickettsioses in Africa. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2008; 22(3):531–44. DOI: 10.1016/j.idc.2008.03.009.
11. Kalivogui S., Boiro M.E., Konstantinov O.K., Plotnikova L.F. [The immune structure against Q-fever and tick-borne spotted fever group rickettsioses in the population and domestic animals of the Republic of Guinea]. *Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2013; (1):28–30.
12. Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.-L., Estrada-Peña A., Horak I.G., Latif A.A., Pegram R.G., Preston P.M. Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species. Edinburgh: Bioscience Reports; 2014. 227 p.
13. Biggerstaff B. PooledInfRate, Version 4.0: An Excel® Add-In to Compute Infection Rates from Pooled Data. Centers for Disease Control and Prevention Fort Collins: Colorado. 2016. (Cited 10 Oct 2023). [Internet]. Available from: <https://github.com/CDCgov/PooledInfRate>.
14. Konstantinov O.K. Les tiques de la famille Ixodidae comme réservoir d'arbovirus en République de Guinée. II. Les arbovirus. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 1990; 43(1):15–22. DOI: 10.19182/remvt.8883.
15. Makenov M.T., Toure A.H., Korneev M.G., Sacko N., Porshakov A.M., Yakovlev S.A., Radyuk E.V., Zakharov K.S., Shipovalov A.V., Boumbaly S., Zhurenkova O.B., Grigoreva Y.E., Morozkin E.S., Fyodorova M.V., Boiro M.Y., Karan L.S. Rhinophallus microplus and its vector-borne haemoparasites in Guinea: further species expansion in West Africa. *Parasitol. Res.* 2021; 120(5):1563–70. DOI: 10.1007/s00436-021-07122-x.
16. Butenko A.M., Trusova I.N. [Incidence of Crimean hemorrhagic fever in Europe, Africa and Asia (1943–2012)]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2013; (5):46–8.
17. O'Hearn A.E., Voorhees M.A., Fetterer D.P., Wauquier N., Coomber M.R., Bangura J., Fair J.N., Gonzalez J.-P., Schoepp R.J. Serosurveillance of viral pathogens circulating in West Africa. *Virol. J.* 2016; 13(1):163. DOI: 10.1186/s12985-016-0621-4.
18. Papa A., Mirazimi A., Köksal I., Estrada-Pena A., Feldmann H. Recent advances in research on Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J. Clin. Virol.* 2015; 64:137–43. DOI: 10.1016/j.jcv.2014.08.029.
19. Naidenova E.V., Zakharov K.S., Kartashov M.Yu., Agafonov D.A., Boiko A.V., Kas'yan Z.A., Senichkina A.M., Nikiforov K.A., Oglozin E.G., Shipovalov A.V., Dubinina A.A., Porshakov A.M., Nouridine I., Diallo M.G., Nassour A.A., Kourouma A., Drame F., Safronov V.A., Lopatin A.A., Boumbali S., Kalivogui S., Boiro M.Y., Shcherbakova S.A., Kuttyrev V.V. [Detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus markers in samples of ixodes ticks collected in the territory of the Republic of Guinea]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (2):93–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-93-98.
20. Rudakov N.V., Samoilenko I.E. [Rickettsia and rickettsioses of the tick-borne spotted fever group]. *Infektsionnye bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2017; (2):43–8.
21. Jensenius M., Davis X., von Sonnenburg F., Schwartz E., Keystone J.S., Leder K., Lopéz-Véléz R., Caumes E., Cramer J.P., Chen L., Parola P.; GeoSentinel Surveillance Network. Multicenter GeoSentinel analysis of rickettsial diseases in international travelers, 1996–2008. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(11):1791–8. DOI: 10.3201/eid1511.090677.
22. Tawana M., Onyiche T.E., Ramatla T., Mtshali S., Thekisoe O. Epidemiology of ticks and tick-borne pathogens in domestic ruminants across Southern African Development Community (SADC) Region from 1980 until 2021: A systematic review and meta-analysis. *Pathogens.* 2022; 11(8):929. DOI: 10.3390/pathogens11080929.
23. Dupont H.T., Cornet J.P., Raoult D. Identification of rickettsiae from ticks collected in the Central African Republic using the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 50(3):373–80. DOI: 10.4269/ajtmh.1994.50.373.
24. Parola P., Inokuma H., Camicas J.L., Brouqui P., Raoult D. Detection and identification of spotted fever group *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in African ticks. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7(6):1014–7. DOI: 10.3201/eid0706.010616.
25. Parola P., Paddock C.D., Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(4):719–56. DOI: 10.1128/CMR.18.4.719-756.2005.
26. Mediannikov O., Diatta G., Fenollar F., Sokhna C., Trape J.F., Raoult D. Tick-borne rickettsioses, neglected emerging diseases in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(9):e821. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000821.
27. Pérez-Tanoira R., Ramos-Rincón J.M., Martín-Martín I., Prieto-Pérez L., Tefasmariam A., Tiziano G., Anda P., González-Martín-Niño R.M., Rodríguez-Vargas M., Górgolas M., Jado I. Molecular survey of *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp., and *Borrelia* spp. in fleas and lice in Ethiopia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2020; 20(1):10–4. DOI: 10.1089/vbz.2019.2500.
28. Djiba M.L., Mediannikov O., Mbengue M., Thiongane Y., Molez J.-F., Seck M.T., Fenollar F., Raoult D., Ndiaye M. Survey of *Anaplasmatidae* bacteria in sheep from Senegal. *Trop. Anim. Health Prod.* 2013; 45(7):1557–61. DOI: 10.1007/s11250-013-0399-y.
29. Nakayima J., Hayashida K., Nakao R., Ishii A., Ogawa H., Nakamura I., Moonga L., Hang'ombe B.M., Mweene A.S., Thomas Y., Orba Y., Sawa H., Sugimoto C. Detection and characterization of zoonotic pathogens of free-ranging non-human primates from Zambia. *Parasit. Vectors.* 2014; 7:490. DOI: 10.1186/s13071-014-0490-x.
30. M'ghirbi Y., Bèji M., Oporto B., Khrouf F., Hurtado A., Bouattour A. *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in cattle in Tunisia. *Parasit. Vectors.* 2016; 9(1):556. DOI: 10.1186/s13071-016-1840-7.
31. Trape J.F., Duplantier J.M., Bouganali H., Godeluck B., Legros F., Cornet J.P., Camicas J.L. Tick-borne borreliosis in West Africa. *Lancet.* 1991; 337(8739):473–5. DOI: 10.1016/0140-6736(91)93404-w.
32. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Specific Indication of Pathogenic Biological Agents. Practice Guidelines]. 2nd ed., revised and updated. Moscow: "Bukva"; 2014. 284 p.
33. Ghoneim N.H., Abdel-Moein K.A., Zaher H.M. Molecular detection of *Francisella* spp. among ticks attached to camels in Egypt. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017; 17(6):384–7. DOI: 10.1089/vbz.2016.2100.
34. Szigeti A., Kreizinger Z., Hornok S., Abichu G., Gyurancz M. Detection of *Francisella*-like endosymbiont in *Hyalomma rufipes* from Ethiopia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5(6):818–20. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.06.002.
35. Mohamed S.E.R., Mubarak A.I., Alfaroq L.O. *Francisella tularensis* bacteremia: a case report from Sudan. *Case Rep. Infect. Dis.* 2012; 2012:405737. DOI: 10.1155/2012/405737.
36. Maurin M., Raoult D. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12(4):518–53. DOI: 10.1128/CMR.12.4.518.
37. Vanderburg S., Rubach M.P., Halliday J.E., Cleaveland S., Reddy E.A., Crump J.A. Epidemiology of *Coxiella burnetii* infection in Africa: a One Health systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(4):e2787. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002787.
38. Panferova Yu.A. [Molecular basis of *Coxiella burnetii* pathogenicity]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2016; 6(1):7–24. DOI: 10.15789/2220-7619-2016-1-7-24.

Authors:

Naidenova E.V., Zakharov K.S., Agafonov D.A., Senichkina A.M., Katyshev A.D., Kuttyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.
 Kartashov M.Yu. State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.
 Diallo M.A., Bah M.B. Research Institute of Applied Biology of Guinea. Kindia, Republic of Guinea.
 Boumbaly S. Research Institute of Applied Biology of Guinea; Kindia, Republic of Guinea. Virology Research Center, Laboratory of Viral Hemorrhagic Fevers of Guinea; Conakry, Republic of Guinea.

Об авторах:

Найденкова Е.В., Захаров К.С., Агафонов Д.А., Сеничкина А.М., Катышев А.Д., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.
 Карташов М.Ю. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.
 Диалло М.А., Бах М.В. Исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи. Гвинейская Республика, Киндия.
 Бумбаль С. Исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи; Гвинейская Республика, Киндия. Исследовательский центр вирусологии, Лаборатория вирусных геморрагических лихорадок Гвинеи; Гвинейская Республика, Конакри.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-125-134

УДК 616.98:579.841.93

Н.А. Осина, Е.Г. Булгакова, А.В. Осин, И.Г. Швиденко, С.А. Щербакова

Вариабельность генов *omp25* и *omp2a* у штаммов бруцелл различного таксономического положения

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

Цель исследования – выявление структурных отличий в генах бруцелл *omp25* и *omp2a*, позволяющих определять их таксономическое положение. **Материалы и методы.** Объектами исследования служили нуклеотидные последовательности полных геномов 48 штаммов бруцелл, представленных в базе данных GenBank NCBI. Для оценки гомологии последовательностей использовали алгоритм BLAST и программу MEGA 11. **Результаты и обсуждение.** У 13 видов бруцелл и *Brucella* spp. с неустановленной видовой принадлежностью воспроизведены *in silico* рестрикционные профили *HindIII*, *EcoRV* и *EcoRI*, *AluI* участков генома, включающих соответственно гены *omp25* и *omp2a*, фланкированные праймерами 25A-25B и 2AB-2AA. В гене *omp25* выявлено 11 несинонимичных и 24 синонимичные мутации; две делеции: Δ103–108 п.н. – у *B. nosferati*, Δ562–597 п.н. – у *B. ovis*; вставка АСТ после 585 п.н. – у *B. vulpis*. Вариабельность гена *omp2a* у изученных штаммов бруцелл была значительно выше. Выявлены 138 SNPs, из них 60 приводят к замене аминокислот, две формируют стоп-кодона, дополнительно одна делеция Δ424–561 п.н. – у *B. abortus* 1, 2, 4-го биоваров. Единичные мутации в генах *omp2a* и *omp25* имели как групповую специфичность – для нескольких видов, так и уникальную – для определенного вида или биовара патогена. Аллельные профили генов *omp25* и *omp2a* обладают большей разрешающей способностью, чем изученные их рестрикционные профили. Выявленные изменения в структуре генов *omp25* и *omp2a* коррелируют с циркуляцией отдельных видов и биоваров бруцелл в организме определенных носителей. В указанных генах показано наличие делеций, вставок и единичных полиморфных нуклеотидов, специфичных для видов, групп видов и в ряде случаев – биоваров патогена.

Ключевые слова: структурная организация, ген *omp25*, ген *omp2a*, нуклеотидная последовательность, аллели, рестрикционный анализ, виды и биовары бруцелл.

Корреспондирующий автор: Осина Наталия Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Осина Н.А., Булгакова Е.Г., Осин А.В., Швиденко И.Г., Щербакова С.А. Вариабельность генов *omp25* и *omp2a* у штаммов бруцелл различного таксономического положения. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:125–134. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-125-134

Поступила 21.11.2023. Отправлена на доработку 01.12.2023. Принята к публ. 07.12.2023.

N.A. Osina, E.G. Boolgakova, A.V. Osin, I.G. Shvidenko, S.A. Shcherbakova

Variability of *omp25* and *omp2a* Genes in *Brucella* Strains of Different Taxonomic Position

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

Abstract. The aim of the study was to identify structural differences in the *Brucella omp25* and *omp2a* genes, which make it possible to determine their taxonomic position. **Materials and methods.** The objects of the study were the nucleotide sequences of the complete genomes of 48 *Brucella* strains presented in the GenBank NCBI database. To assess sequence homology, the BLAST algorithm and the MEGA 11 program were used. **Results and discussion.** In 13 species of *Brucella* and *Brucella* spp. with unknown species appurtenance, *HindIII*, *EcoRV* and *EcoRI*, *AluI* restriction profiles of genome regions have been reproduced *in silico*, including, *omp25* and *omp2a* genes, flanked by primers 25A-25B and 2AB-2AA, respectively. In the *omp25* gene, 11 non-synonymous and 24 synonymous mutations have been detected; two deletions: Δ103–108 bp – in *B. nosferati*, Δ562–597 bp – in *B. Ovis*; and ACT insertion after 585 bp – in *B. vulpis*. The variability of the *omp2a* gene in the studied *Brucella* strains was significantly higher. 138 SNPs have been identified, of which 60 lead to amino acid substitutions, 2 – form stop codons, and an additional deletion Δ424–561 bp – in *B. abortus* 1, 2, 4 biovars. Single mutations in the *omp2a* and *omp25* genes had both group specificity – for several species, and unique – for a specific species or biovar of the pathogen. Allelic profiles of the *omp25* and *omp2a* genes have greater resolution than their restriction profiles studied. The identified changes in the structure of the *omp25* and *omp2a* genes correlate with the circulation of individual *Brucella* species and biovars in the organism of certain carriers. These genes show the presence of deletions, insertions and single polymorphic nucleotides specific to species, groups of species and, in some cases, biovars of the pathogen.

Key words: structural organization, *omp25* gene, *omp2a* gene, nucleotide sequence, alleles, restriction analysis, *Brucella* species and biovars.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Natalia A. Osina, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Osina N.A., Boolgakova E.G., Osin A.V., Shvidenko I.G., Shcherbakova S.A. Variability of *omp25* and *omp2a* Genes in *Brucella* Strains of Different Taxonomic Position. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:125–134. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-125-134

Received 21.11.2023. Revised 01.12.2023. Accepted 07.12.2023.

Osin A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0954-5683>
Boolgakova E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2405-2684>

Osin A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5308-0022>
Shcherbakova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

В настоящее время в соответствии с номенклатурой, представленной в LPSN (List of procariotic names with standing in nomenclature), в роде *Brucella* выделяют двенадцать самостоятельных видов бруцелл, вызывающих заболевания людей и животных: *B. abortus* – 7 биоваров, *B. melitensis* – 3 биовара, *B. suis* – 5 биоваров, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata*, *B. papionis*, *B. vulpis* [1]. Отмечены случаи выделения бруцелл с неустановленным систематическим положением от земноводных [2–6]. В 2023 г. открыт новый вид бруцелл – *Brucella nosferati*, выделенных от летучих мышей-вампинов *Desmodus rotundus* [6].

Внутривидовая гомология генетической структуры бруцелл достигает 95 % [7]. В то же время выявлены отдельные области – геномные острова (IncP, GI-1, GI-2, GI-3, CI-5, CI-6, GI-8, SAR1-2 и др.) и другие участки генома, представленные в разной степени у различных представителей рода *Brucella* [7–9]. Среди них можно выделить гены *omp*, кодирующие синтез белков наружной мембраны бруцелл, которые играют важную роль в патогенезе возбудителя: адгезия к клеткам хозяина, уклонение от иммунной системы макроорганизма, обеспечение транспорта питательных веществ и других компонентов за счет формирования пор во внешней мембране [10]. Методом рестрикционного анализа установлена вариабельность *omp31*, *omp25*, *omp25b*, *omp25c*, *omp25d*, *omp22*, *omp2a*, *omp2b* у ряда видов и биоваров возбудителя бруцеллеза: *B. abortus* 1, 2, 4-го биоваров, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. neotomae* [11–13]. Показана эффективность применения предложенных подходов для идентификации коллекционных штаммов бруцелл [14, 15]. Однако изменчивость генов по рестрикционному профилю была установлена для ограниченного круга бруцелл. Детальный анализ структуры генов *omp* у бруцелл с различной таксономической принадлежностью позволит оценить возможности применения их вариабельности для видовой и внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза.

Цель данного исследования состояла в выявлении структурных отличий в генах бруцелл *omp25* и *omp2a*, позволяющих определять их таксономическое положение.

Материалы и методы

Объектами исследования служили полногеномные последовательности 48 штаммов бруцелл, представленные в базе данных GenBank NCBI, из них: 9 типовых, 12 референтных (для биоваров *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) штаммов патогена, а также 28 штаммов бруцелл, у которых в аннотации указано таксономическое положение (*B. suis* 1–5-го биоваров, виды *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti*,

B. pinnipedialis, *B. inopinata*, *B. vulpis*, *B. nosferati* и бруцеллы с неустановленной видовой принадлежностью (табл. 1), из которых детально анализировали фланкированные праймерами 25A-25B и 2AB-2AA фрагменты генома бруцелл размером 758 п.н. и 1233 п.н. по A. Cloeckaert *et al.* [11], которые содержат последовательности генов *omp25* и *omp2a* соответственно.

Для оценки вариабельности нуклеотидных последовательностей использовали базу данных GenBank NCBI с алгоритмом BLAST и программе MEGA 11. В качестве референса использовали полный геном *B. abortus* 9-941 (GenBank NCBI № AE017223.1).

Результаты и обсуждение

Рестрикционный профиль областей 25A-25B (ген *omp25*) и 2AB-2AA (ген *omp2a*) у бруцелл различной таксономической принадлежности. Ранее A. Cloeckaert *et al.* [11] показали вариабельность фрагментов генов *omp25* и *omp2a* у ряда видов бруцелл. Фрагменты геномов, ограниченные праймерами 25A и 25B, 2AB и 2AA, содержащие последовательности данных генов соответственно, обрабатывали различными рестриктазами с последующим разделением полученных фрагментов с помощью гель-электрофореза. Среди тестированных авторами рестриктаз наибольшей дифференцирующей способностью обладали *HindIII* и *EcoRV* в отношении области 25A-25B и *EcoRI* и *AluI* при рестрикции области 2AB-2AA: определение принадлежности к *B. abortus* 1, 2, 4-го биоваров, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. neotomae*. Предложенный подход был успешно использован нами при изучении коллекционных штаммов возбудителя бруцеллеза [15]. Однако в обеих работах оценивалась вариабельность указанных участков генома только у шести видов бруцелл: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* – и не были определены размеры рестрикционных фрагментов.

В настоящей работе проведен рестрикционный анализ *in silico* этих областей генома у штаммов 13 видов бруцелл и *Brucella* spp. с неустановленной видовой принадлежностью (табл. 1). Выявлялось количество и взаиморасположение указанных сайтов рестрикции, а также прогнозировались размеры рестрикционных фрагментов у бруцелл различной таксономической принадлежности. Результаты наших исследований мы сравнили с данными зарубежных коллег.

Установлено, что в области 25A-25B имеется по одному сайту рестрикции *HindIII* и *EcoRV* (рис. 1). Большинство бруцелл имеют одинаковый рестрикционный профиль – P1_{HindIII} (467 и 291 п.н.) и P1_{EcoRV} (649 и 109 п.н.) соответственно. Характерные профили отмечены у *B. ovis* – P2_{HindIII} (467 и 255 п.н.)

Таблица 1 / Table 1

Перечень нуклеотидных последовательностей бруцелл, использованных в работе
List of *Brucella* nucleotide sequences used in the work

№	Штамм Strain	Type/reference	GenBank NCBI №
1	<i>B. abortus</i> bv. 1 9-941	–	AE017223.1
2	<i>B. abortus</i> bv. 2 86/8/59 ATCC 23449	Reference	CP007765.1
3	<i>B. abortus</i> bv. 3 Tulya ATCC 23450	Reference	ACBI01000007.1 ACBI01000005.1
4	<i>B. abortus</i> bv. 4 292 ATCC23451	Reference	JMSB01000016.1 JMSB01000015.1
5	<i>B. abortus</i> bv. 5 3196 ATCC 23452	Reference	CP007707.1
6	<i>B. abortus</i> bv. 6 870 ATCC23453	Reference	CP007709.1
7	<i>B. abortus</i> bv. 9 C68 ATCC23455	Reference	CP007705.1
8	<i>B. melitensis</i> bv. 1 16M ATCC23456	Type	CP007763.1
9	<i>B. melitensis</i> bv. 2 63/9 ATCC23445	Reference	CP007789.1
10	<i>B. melitensis</i> bv. 3 706 ATCC23458	Reference	CP007760.1
11	<i>B. suis</i> bv. 1 1330 ATCC23444	Type	CP002997.1
12	<i>B. suis</i> bv. 1 S2	–	CP006961.1
13	<i>B. suis</i> bv. 2 Thomsen ATCC23445	Reference	CP000911.1
14	<i>B. suis</i> bv. 2 Bs143CITA	–	CP007695.1
15	<i>B. suis</i> bv.3 686 ATCC23446	Reference	CP007719.1
16	<i>B. suis</i> bv. 3 CVI_71	–	CP054957.1
17	<i>B. suis</i> bv. 4 40 ATCC 23447	Reference	ACJK01000011.1 AZBG02000003.1
18	<i>B. suis</i> bv. 4 BSP	–	CP008757.1
19	<i>B. suis</i> bv. 5 513UK BCCN R21	Reference	CP007717.1
20	<i>B. suis</i> bv. 5 CVI_73	–	CP054953.1
21	<i>B. canis</i> ATCC 23365	Type	CP000872.1
22	<i>B. canis</i> FDAARGOS_420	–	CP023974.1
23	<i>B. canis</i> SVA13	–	CP007629.1
24	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Type	CP000708.1
25	<i>B. ovis</i> 81/8	–	AQKO01000006.1 AQKO01000005.1
26	<i>B. ovis</i> 63/96	–	AQKN01000002.1
27	<i>B. neotomae</i> 5K33	Type	ACEH01000046.1 U26441.1
28	<i>B. neotomae</i> NCTC10070	–	UAQT01000004.1
29	<i>B. neotomae</i> NCTC10071	–	UAQU01000004.1
30	<i>B. ceti</i> M644/93/1	–	ACBO01000060.1
31	<i>B. ceti</i> M13/05/1	–	ACBP01000069.1
32	<i>B. ceti</i> BD1442	–	LC484043.1
33	<i>B. ceti</i> Cudo	–	ACJD01000002.1
34	<i>B. pinnipedialis</i> 6/566	–	CP007743.1
35	<i>B. pinnipedialis</i> B2/94	Type	CP002078.1
36	<i>B. microti</i> CCM 4915	Type	CP001578.1
37	<i>B. inopinata</i> BO1	Type	AZBI02000145.1 ADEZ01000026.1
38	<i>B. inopinata</i> FO700662 6	–	JARQXC010000006.1
39	<i>B. vulpis</i> F60	Type	LN997863.1
40	<i>B. vulpis</i> F965	–	LN998033.1
41	<i>B. nosferati</i> bbatCR03	–	CP106870.1
42	<i>Brucella</i> sp. 10RB9215	–	LT599047.1
43	<i>Brucella</i> sp. 09RB8910	–	CP019390.1
44	<i>Brucella</i> sp. 09RB8471	–	CP019347.1
45	<i>Brucella</i> sp. 2594	–	CP103960.1
46	<i>Brucella</i> sp. 2716	–	CP103962.1
47	<i>Brucella</i> sp. BO3	–	CP047232.1
48	<i>Brucella</i> sp. 2280	–	CP045697.1

Примечание: bv. – биовар; Type – типовой штамм; Reference – референтный штамм.

Note: bv. – biovar; Type – type strain; Reference – reference strain.

и P2_{EcoRV} (613 и 109 п.н.), *B. vulpis* – P3_{HindIII} (467 и 294 п.н.) и P3_{EcoRV} (652 и 109 п.н.), *B. nosferati* – P4_{HindIII} (461 и 291 п.н.) и P4_{EcoRV} (643 и 109 п.н.). У *B. melitensis* всех биоваров отсутствует сайт рестрикции

EcoRV, поскольку в этой области наблюдается замена A613T (рис. 1).

Полученные нами результаты по количеству фрагментов, образующихся при гидролизе указан-

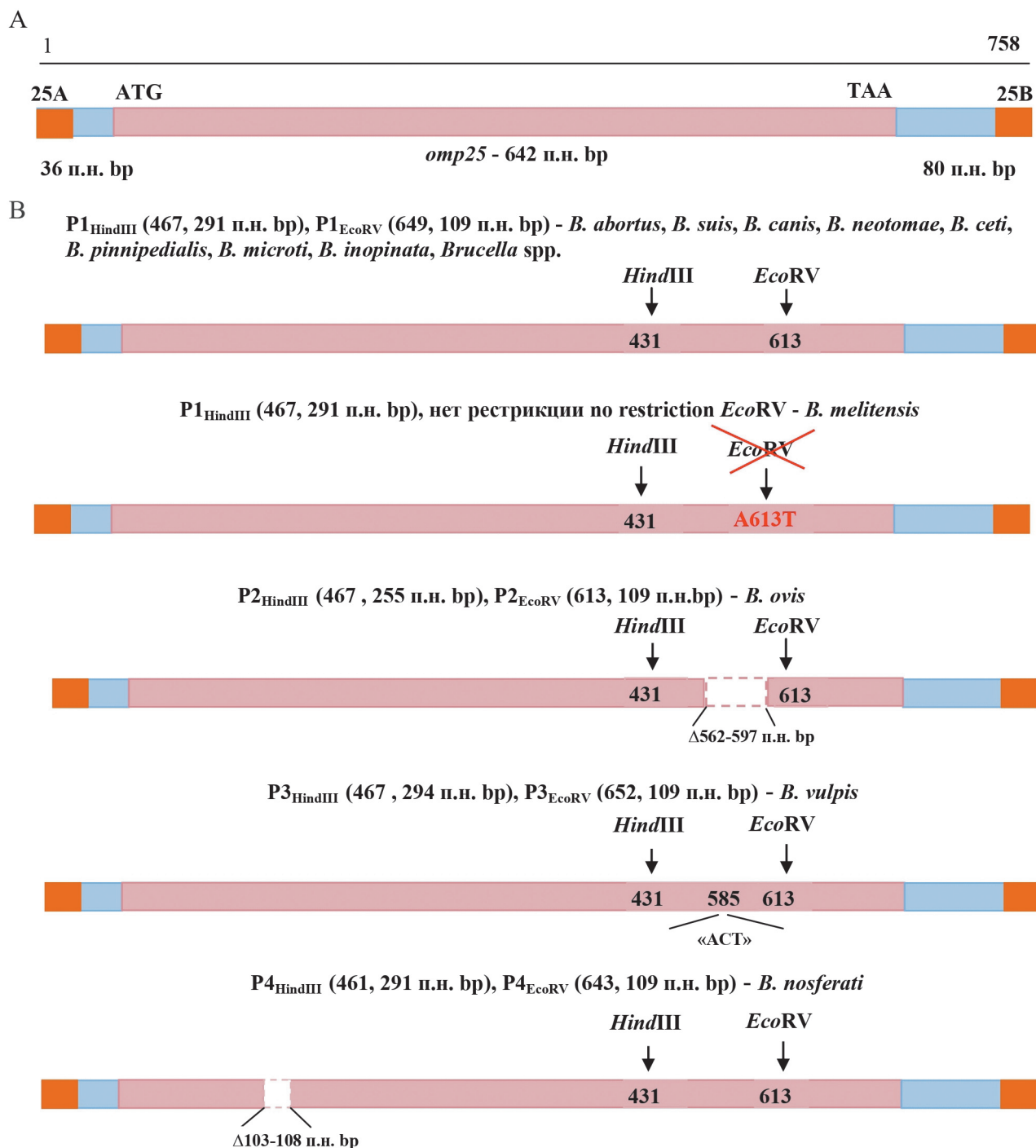


Рис. 1. Анализ структуры области 25A-25B бруцелл:

A – фрагмент генома патогена размером 758 п.н., содержащего ген *omp25*, фланкированный праймерами 25A-25B по A. Cloeckeaert *et al.* [11] (область 25A-25B): оранжевым выделено положение праймеров; голубым – участки межгенного пространства, ограниченные праймерами (36 п.н. слева и 80 п.н. справа от гена); розовым – ген *omp25*; ATG – старт-кодон; TAA – стоп-кодон;

B – рестрикционные профили области 25A-25B: цифрами обозначены нуклеотиды, по которым происходит рестрикция ферментами *HindIII* и *EcoRV* или происходят мутации: SNP, делеции, вставки (нумерация от старт-кодона)

Fig. 1. Analysis of the structure of the 25A-25B region in *Brucella*:

A – fragment of the pathogen genome 758 bp in size, containing the *omp25* gene, flanked by primers 25A-25B. Cloeckeaert *et al.* [11] (25A-25B region): the position of the primers is highlighted in orange; blue – areas of intergenic space limited by primers (36 bp to the left and 80 bp to the right of the gene); pink – *omp25* gene; ATG – start-codon; TAA – stop-codon;

B – restriction profiles of the 25A-25B region: numbers indicate nucleotides at which restriction with the enzymes *HindIII* and *EcoRV*, or mutations occur: SNP, deletions, insertions (numbering from the start-codon)

ными рестриктазами, совпали с данными, приведенными зарубежными авторами для *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*. Дополнительно для этих видов нами определены точные размеры фрагментов *Hind*III и *Eco*RV области 25А-25В. Кроме того, установлены рестрикционные профили для *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata* и *Brucella* spp. с неустановленной видовой принадлежностью ($P1_{HindIII}$, $P1_{EcoRV}$), а для *B. vulpis* ($P3_{HindIII}$, $P3_{EcoRV}$) и *B. nosferati* ($P4_{HindIII}$, $P4_{EcoRV}$) рестрикционные профили оказались уникальными (рис. 1). В итоге области 25А-25В изученных бруцелл формировали четыре рестрикционных профиля *Hind*III и пять – *Eco*RV.

При анализе области 2АВ-2АА выявлено два сайта рестрикции *Eco*RI, четыре или пять сайтов – *Alu*I (рис. 2). Большинство бруцелл имеют одинаковый *Eco*RI рестрикционный профиль $P1_{EcoRI-2a}$ (660, 371 и 202 п.н.). У *B. abortus* 1, 2 и 4-го биоваров из-за наличия делеции Δ424–561 п.н. отсутствует один из сайтов рестрикции, что приводит к образованию характерного для них профиля – $P2_{EcoRI-2a}$ (724 и 371 п.н.). У *B. nosferati* мутация А283G также приводит к отсутствию одного из сайтов рестрикции *Eco*RI. В результате формируется профиль рестрикции $P3_{EcoRI-2a}$ (660 и 573 п.н.).

У изученных бруцелл превалирует профиль $P1_{AluI-2a}$ (657, 275, 163, 126 и 12 п.н.) *Alu*I области 2АВ-2АА. У штаммов *B. abortus* 1, 2, 4-го биоваров в результате делеции Δ424–561 п.н. профиль изменился на $P2_{AluI-2a}$ (519, 275, 163, 126 и 12 п.н.); у *B. ovis* мутация G63A приводит к образованию дополнительного сайта рестрикции и появлению профиля $P3_{AluI-2a}$ (657, 260, 163, 126, 15 и 12 п.н.). Для *B. neotomae* и *B. vulpis* мутация G981A исключает один из сайтов рестрикции и формирует профиль $P4_{AluI-2a}$ (820, 275, 163, 126 и 12 п.н.); у *B. nosferati* замена G324А убирает один из сайтов рестрикции, добавляя новый профиль $P5_{AluI-2a}$ (932, 163, 126 и 12 п.н.). У штамма *Brucella* sp. 2280, выделенного от амфибий, благодаря мутации G831Т образуется дополнительный сайт рестрикции, создавая профиль $P6_{AluI-2a}$ (505, 275, 163, 152, 126, 12 п.н.) (рис. 2). Ведущую роль в формировании различных рестрикционных профилей области 2АВ-2АА играют единичные мутации, которые приводят к образованию новых или утрате имеющихся сайтов рестрикции ферментами *Eco*RI и *Alu*I.

Как видно из приведенных результатов, рестрикционный анализ областей 25А-25В и 2АВ-2АА обладает приблизительно одинаковой видовой и внутривидовой дифференцирующей способностью для бруцелл. Совместное определение рестрикционных профилей указанных областей позволяет дифференцировать *B. abortus* 1, 2, 4-го биоваров, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. vulpis*, *B. nosferati* и *Brucella* sp. 2280 с неустановленной видовой принадлежностью. В то же время для разделения близких по размеру фрагментов в агарозном геле

может потребоваться фиксация фанггерпринтов в нескольких временных интервалах с тщательным подбором процентности и качества геля, но даже это может оказаться недостаточным для разделения таких фрагментов. Определение нуклеотидной последовательности спорных по размеру фрагментов потребует дополнительного времени и будет затруднять определение таксона изучаемого штамма. Поэтому нами изучена видовая и внутривидовая вариабельность генов *omp25* и *omp2a* на основе определения их нуклеотидных последовательностей с выявлением мутаций, пригодных для определения таксономического положения штаммов бруцелл.

Анализ вариабельности гена *omp25* у штаммов бруцелл различной таксономической принадлежности. В ходе проведенного анализа в гене *omp25* бруцелл выявлено 11 несинонимичных единичных мутаций, приводящих к замене аминокислот: T98С (Cys33Ala), G191А и С192Т (Ser64Asn), C227G (Ala76Gly), C256А (Gln86Lys), G286А (Asp96Lys), C386Т (Pro129Leu), C416Т (Ala139Cys), G582С (Thr194Ser), C584А (Thr195Asn), A613Т (Ile205Phe); 24 синонимичные мутации: G39А, C40Т, T120С, C144Т, T162С, T168С, C189Т, T198G, C234Т, C261Т, C273Т, T276С, C351Т, C369Т, G405А, C417Т, C450Т, C453Т, C519Т, C522G, T567С, T579С, T585G, T588С; две делеции: Δ103–108 п.н. (Δ35Ala36Pro), Δ562–597 п.н. (Δ188Asn, 189Tyr, 190Asp, 191Leu, 192Ala, 193Gly, 194Thr, 195Thr, 196Cys, 197Arg, 198Asn, 199Lys); вставка АСТ после 585 п.н.

У штаммов *B. abortus* вне зависимости от их биоварной принадлежности в позиции 168 гена *omp25* находится нуклеотид Т, тогда как у других видов бруцелл в этой позиции – нуклеотид С. Для *B. melitensis* характерны две синонимичные замены: C40Т, C369Т и одна несинонимичная – A613Т (Ile205Phe). Дополнительные замены выявлены у референтного штамма *B. melitensis* 63/9 2-го биовара – T276С и у *B. melitensis* 706 3-го биовара – C416Т (Ala139Cys). Специфичность данных мутаций для *B. melitensis* 2-го и 3-го биоваров можно будет уточнить исследованиями более широкой выборки штаммов этих биоваров. *B. suis* 1, 3, 4-го биоваров, *B. pinnipedialis*, *B. microti* несут в гене *omp25* только замену T168С, тогда как *B. suis* 2-го и 5-го биоваров – дополнительно C522G, *B. canis* – C256А (Gln86Lys), C522G, *B. ceti* – C351Т, *B. neotomae* – G39А, T168С, C386Т (Pro129Leu).

Более значительные изменения гена *omp25* отмечены у *B. ovis*, *B. inopinata*, *B. vulpis* и *Brucella* spp. с неопределенной видовой принадлежностью. Только для *B. ovis* в данном гене характерны замены G286А (Asp96Lys), G405А и делеция Δ562–597 размером 36 п.н. (потеря аминокислот: 188Asn, 189Tyr, 190Asp, 191Leu, 192Ala, 193Gly, 194Thr, 195Thr, 196Cys, 197Arg, 198Asn, 199Lys). У *B. vulpis* выявлены специфичные замены C581G и G582С (Thr194Ser), T585G и АСТ-вставка после 585 п.н. Для *B. nosferati* отмечено наличие делеции 6 нуклео-

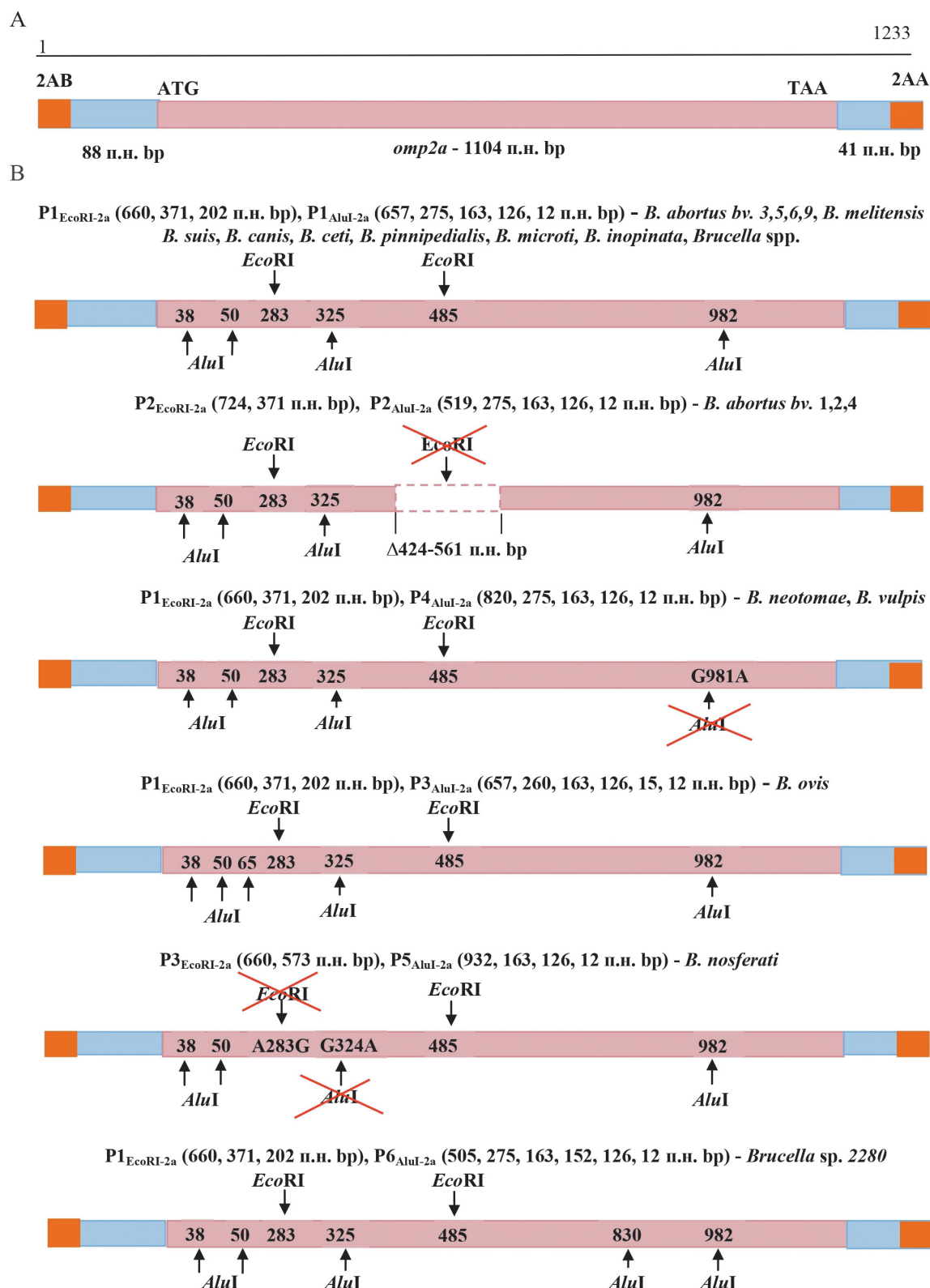


Рис. 2. Анализ структуры области 2AB-2AA:

A – фрагмент генома бруцелл размером 1233 п.н., содержащего ген *omp2a*, фланкированный праймерами 2AB-2AA по A. Cloeckaert *et al.* [11] (область 2AB-2AA): оранжевым выделено положение праймеров; голубым – участки межгенного пространства, ограниченные праймерами (88 п.н. слева и 41 п.н. справа от гена); розовым – ген *omp2a*; ATG – старт-кодон; TAA – стоп-кодон; *B* – рестрикционные профили области 2AB-2AA: цифрами обозначены нуклеотиды, по которым происходит рестрикция ферментами *EcoRI* и *AluI* или происходят мутации (SNP) (нумерация от старт-кодона); bv. – биовар

Fig. 2. Analysis of the structure of the 2AB-2AA region:

A – fragment of the *Brucella* genome, 1233 bp in size, containing the *omp2a* gene and flanked by primers 2AB-2AA. Cloeckaert *et al.* [11] (2AB-2AA region): the position of the primers is highlighted in orange; the sections in blue are intergenic space limited by primers (88 bp to the left and 41 bp to the right of the gene); pink – *omp2a* gene; ATG – start-codon; TAA – stop-codon; *B* – restriction profiles of the 2AB-2AA region: numbers indicate nucleotides at which restriction by the enzymes *EcoRI* and *AluI*, or mutations occur (SNP) (numbering from the start-codon); bv. – biovar

тидов Δ103–108 п.н. (35Ala36Pro) и замена T98C (Cys33Ala). Проведенный анализ показал, что для *B. inopinata*, *B. vulpis* и *Brucella* spp. с неуточненной видовой принадлежностью характерны замены, которые не встречаются у других видов патогена: T162C, T198G, C227G (Ala76Gly), T567C, C584A (Thr196Asn), T588C.

Возникновение делеции Δ562–597 размером 36 п.н. у *B. ovis* связано с гомологичной рекомбинацией между двумя прямыми повторами GCAACAAG, которые фланкируют участок размером 28 п.н. Образование делеции Δ103–108 п.н. (35Ala36Pro), выявленной у *B. nosferati*, имеет другое происхождение, поскольку в данной области повторы не обнаружены. Замены, делеции и вставки, которые выявлены у *B. melitensis* 3-го биовара, *B. canis*, *B. ovis*, *B. vulpis*, *B. nosferati*, могут привести к увеличению гидрофильности белка Omp25 за счет снижения количества гидрофобных аминокислот, что, возможно, повлияет на изменение иммунного ответа макроорганизма, на инфицирование этими видами бруцелл, поскольку данный белок подавляет синтез TNF макрофагами и дендритными клетками.

Исследование нуклеотидной последовательности гена *omp25* позволило выделить 18 аллелей, характерных для отдельных видов или групп видов: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* биоваров 1, 3, 4, *B. suis* биоваров 2, 5 / *B. pinnipedialis* / *B. microti*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. inopinata*, *B. vulpis*, *B. nosferati* и *Brucella* spp. с неустановленной видовой принадлежностью (табл. 2). Определение аллельного спектра гена *omp25* значительно расширяет возможности видовой дифференциации бруцелл (18 аллелей) по сравнению с рестрикционным анализом (4, 5 рестрикционных профиля).

Анализ вариабельности гена *omp2a* у штаммов бруцелл различной видовой и биоварной принадлежности. Вариабельность гена *omp2a* у изученных штаммов бруцелл была значительно выше. Выявлены 76 синонимичных замен и 62 несинонимичные мутации, приводящие в 60 случаях к замене аминокислот и в двух – к образованию стоп-кодона, а также одна делеция Δ424–561 п.н. Выявленные полиморфизмы имели как групповую специфичность для нескольких видов, так и уникальную – для определенного вида или биовара патогена (табл. 3).

Все штаммы *Brucella* spp., кроме *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. nosferati*, имеют следующие замены: T213C±, C222T±, T223A (Ser75Thr), T228C/A229T/C231G (Thr77Ser), C234T, C237T, T240R (Asn80Lys), C901A (Pro301Thr). Только штаммы *B. suis* 1–4-го биоваров и *B. canis* имеют две несинонимичные замены – T722C (Cys241Ala) и T736C (Ser246Pro), которые приводят к замене двух гидрофильных аминокислот – цистеина и серина – на две гидрофобные – аланин и пролин соответственно, что может изменить гидрофильность белка Omp2a и, как следствие, процесс образования пор во внешней мембране патогена.

Таблица 2 / Table 2

Аллели генов *omp25* и *omp2a*, выявленные в работе
 Alleles of *omp25* and *omp2a* genes, identified within the frames of the work

Вид, биовар бруцелл <i>Brucella</i> species, biovar	Аллель / Allele	
	ген <i>omp25</i> <i>omp25</i> gene	ген <i>omp2a</i> <i>omp2a</i> gene
<i>B. abortus</i> bv. 1, 2, 4	1	1
<i>B. abortus</i> bv. 3, 5, 6, 9	1	2
<i>B. melitensis</i> bv. 1–3	2	2
<i>B. suis</i> bv. 1	3	3
<i>B. suis</i> bv. 2	4	4
<i>B. suis</i> bv. 3	3	5
<i>B. suis</i> bv. 4	3	6
<i>B. suis</i> bv. 5	4	7
<i>B. canis</i>	5	6
<i>B. ovis</i>	6	8
<i>B. neotomae</i>	7	9
<i>B. ceti</i>	8	10
<i>B. pinnipedialis</i>	4	10
<i>B. microti</i>	4	10
<i>B. inopinata</i>	9	11
<i>B. vulpis</i>	10	12
<i>B. nosferati</i>	11	13
<i>Brucella</i> sp. 10RB9215	12	14
<i>Brucella</i> sp. 09RB8910	13	15
<i>Brucella</i> sp. 09RB8471	14	16
<i>Brucella</i> sp. 2594	15	17
<i>Brucella</i> sp. 2716	16	18
<i>Brucella</i> sp. BO3 (WHO)	17	19
<i>Brucella</i> sp. 2280	18	20

Примечание: bv. – биовар.

Note: bv. – biovar.

Среди групповых мутаций можно выделить биспецифичные замены для *B. neotomae* и *B. vulpis*: C963G, C966T, C972T, C979G/G981A (Gln327Glu), C984G, C990T, A993C, A1000G (Ile334Cys). Обозначенные несинонимичные замены могут увеличить гидрофильность белка и изменить его заряд. Изменения, характерные только для *B. neotomae* – C542A (Ala181Asp) и *B. vulpis* – G568T (Ala190Ser), C815T (Ala272Cys), при которых нейтральная гидрофобная аминокислота Ala замещается на аминокислоты с лучшей растворимостью и, в последнем случае, на нейтральную гидрофильную, приведут к повышению гидрофильных свойств белка.

Наибольшие изменения нуклеотидных последовательностей гена *omp2a* наблюдаются у *B. abortus* 1, 2 и 4-го биоваров, *B. suis* 2-го биовара, *B. ovis* и *B. nosferati*. Для *B. abortus* 1, 2 и 4-го биоваров характерна делеция размером 130 п.н. (Δ424–561 п.н.) в результате гомологичной рекомбинации по восьмичленному нуклеотидным повторам GCACCGGC. Как следствие, штаммы этих биоваров продуцируют усеченную аминокислотную последовательность (321 аминокислота из 367).

Таблица 3 / Table 3

Групповые и единичные мутации, выявленные в гене *omp2a* у изученных штаммов бруцелл
Group and single mutations detected in the *omp2a* gene in the studied strains of *Brucella*

Полиморфные нуклеотиды, в скобках указана замена аминокислот в случае несинонимичных мутаций Polymorphic nucleotides, amino acid substitutions in case of non-synonymous mutations are indicated in parentheses	Виды бруцелл <i>Brucella</i> species
Мутации, специфичные для нескольких видов бруцелл Mutations specific to several <i>Brucella</i> species	
T213C±, C222T±, T223A (Ser75Thr), T228C, A229T/C231G (Thr77Ser), C234T, C237T, T240R (Asn80Lys), C901A (Pro301Thr)	<i>Brucella</i> spp., кроме <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. nosferati</i> <i>Brucella</i> spp. except <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. nosferati</i>
T722C (Cys241Ala), T736C (Ser246Pro)	<i>B. suis</i> bv. 1–4, <i>B. canis</i>
G175A (Cys59Ile), C178A/A179G/T180C (His60Ser), T183C±	<i>Brucella</i> spp., кроме <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> bv. 1, 3, 4, <i>B. canis</i> , <i>B. nosferati</i> <i>Brucella</i> spp. except <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> bv. 1, 3, 4, <i>B. canis</i> , <i>B. nosferati</i>
C963G, C966T, C972T, C979G/G981A (Gln327Glu), C984G, C990T, A993C, A1000G (Ile334Cys)	<i>B. neotomae</i> , <i>B. vulpis</i>
T318C, C330T, C399T±, A630G A801T, C813T±, T852C, T885C, T978C*	<i>B. inopinata</i> , <i>B. vulpis</i> , <i>Brucella</i> spp. с неуточненной видовой принадлежностью <i>B. inopinata</i> , <i>B. vulpis</i> , <i>Brucella</i> spp. with unspecified species appurtenance
G388A/A389G (Asp130Ser), C391G/G392T (Arg131Cys) G388A (Asp130Asn), C391G/G392T (Arg131Cys)	<i>B. vulpis</i> , <i>Brucella</i> spp. с неуточненной видовой принадлежностью <i>B. vulpis</i> , <i>Brucella</i> spp. with unspecified species appurtenance
A993C	<i>B. suis</i> bv. 5, <i>B. inopinata</i> , <i>Brucella</i> spp. с неуточненной видовой принадлежностью <i>B. suis</i> bv. 5, <i>B. inopinata</i> , <i>Brucella</i> spp. with unspecified species appurtenance
Мутации, специфичные для одного вида и биовара бруцелл Mutations specific to one species and biovar of <i>Brucella</i>	
Δ424–561 нуклеотид / nucleotide	<i>B. abortus</i> bv. 1, 2, 4
C911T (Ala304Cys)	<i>B. suis</i> bv. 1
G752A (образование стоп-кодона TAG / formation of stop codon TAG)	<i>B. suis</i> bv. 2
T877C (Trp293 Arg)	<i>B. suis</i> bv. 3
G63A, C129T, C255T, C264T, G409A (Gly137Ser), G517A (Cys173Ile), T531C, C534G, G535A (Cys179Ile), G538T/T540G (Ala180Ser), G1040A (образование стоп-кодона TAG / formation of stop codon TAG)	<i>B. ovis</i>
A87G, C542A (Ala181Asp), T598C (Ser200Pro), C954G	<i>B. neotomae</i>
C78T, C534T, G568T (Ala190Ser), C654T, T660C, C815T (Ala272Cys), G933C, A1021T (Thr341 Ser)	<i>B. vulpis</i>
A271C/T272G/G273T (Met91Arg), T274G/C276T (Phe92Cys), A277T/A278C (Asn93Ser), G282C/A283G/A284G (Asn95Gly), A306C, G310A/G311A/C312G (Gly104Lys), A317T (Tyr106 Phe), T321C, C322G/G324A (Gln108 Glu), C339T, A340G/C342T (Thr114 Ala), A343G/G344C/C345G (Ser115Ala), A757G/A759C (Thr253 Ala), G791	<i>B. nosferati</i>

Примечание: bv. – биовар.

Note: bv. – biovar.

B. suis 2-го биовара из-за наличия мутации G752A, которая приводит к преждевременной термине транскрипции и образованию стоп-кодона, также продуцируют усеченную аминокислотную последовательность (250 аминокислот из 367). У *B. ovis* пять несинонимичных мутаций приводят к замене четырех аминокислот: G409A (Gly137Ser), G517A (Cys173Ile), G535A (Cys179Ile), G538T/T540G (Ala180Ser), – а одна G1040A – к образованию стоп-кодона TAG, из-за чего синтезируется укороченная аминокислотная последовательность белка Omp2a

(346 аминокислот из 367). У штаммов нового вида бруцелл *B. nosferati* отмечено значительное количество несинонимичных мутаций в начале нуклеотидной последовательности гена *omp2a*: A271C/T272G/G273T (Met91Arg), T274G/C276T (Phe92Cys), A277T/A278C (Asn93Ser), G282C/A283G/A284G (Asn95Gly), A306C, G310A/G311A/C312G (Gly104Lys), A317T (Tyr106 Phe), T321C, C322G/G324A (Gln108Glu), A340G/C342T (Thr114Ala), A343G/G344C/C345G (Ser115Ala) – и единичные в конце – A757G/A759C (Thr253Ala).

Количество аллелей гена *omp2a* значительно выше, чем гена *omp25*, – практически все выбранные для анализа штаммы имели уникальную структуру данного гена (табл. 2). Используя анализ нуклеотидной последовательности данного гена, возможно дифференцировать *B. abortus* биоваров 1, 2, 4, *B. abortus* биоваров 3, 5, 6, 9 / *B. melitensis*, *B. suis* биовара 1, *B. suis* биовара 2, *B. suis* биовара 3, *B. suis* биовара 5, *B. suis* биовара 4 / *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti* / *B. pinnipedialis* / *B. microti*, *B. inopinata*, *B. vulpis*, *B. nosferati* и отдельные *Brucella* spp. с неустановленной видовой принадлежностью.

В процессе адаптации *Brucella* spp. к определенным видам хозяина ген *omp2a* бруцелл приобрел ряд изменений, связанных с делетированием и полиморфизмом единичных нуклеотидов, которые могут влиять на гидрофильность и заряд белка Omp2a и даже приводить к утрате его функции. Это, скорее всего, меняет конфигурацию образующихся пор, а значит, и доступность определенных питательных веществ. Представляет интерес изучение изменения третичной структуры и, как следствие, изменение порообразующей способности белков Omp2a с усеченной аминокислотной последовательностью, синтезируемых штаммами *B. abortus* 1, 2 и 4-го биоваров, *B. suis* 2-го биовара и *B. ovis*.

Виды и биовары бруцелл отличаются по вирулентности для определенных видов животных и человека [9, 16]. Они отличаются по ряду фенотипических признаков: способности к продукции сероводорода и уреазы, отношению к избыточному содержанию углекислоты в воздухе, степени резистентности к бактериостатическому действию красителей (основного фуксина и тионина), агглютинабельности моноспецифическими сыворотками Abortus и Melitensis, чувствительности к диагностическим бруцеллезным бактериофагам [16]. Отмечены вариации генетической структуры возбудителя бруцеллеза различного таксономического положения [7, 8].

В представленной работе установлены *in silico* количество и размеры рестриктов HindIII, EcoRV и EcoRI, AluI участков генома бруцелл, фланкированных праймерами 25A-25B и 2AB-2AA по A. Cloeckaert *et al.* [11], которые содержат последовательности генов *omp25* и *omp2a* соответственно. Подтверждена возможность использования рестрикционного анализа, описанного зарубежными авторами, для дифференциации *B. abortus* биоваров 1, 2, 4, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. neotomae*. Помимо этого, дополнительно выявлены специфичные рестрикционные профили для *B. vulpis*, *B. nosferati* и *Brucella* sp. 2280 с неустановленной видовой принадлежностью, которые не изучались в работе зарубежных авторов, поскольку на тот момент еще не были открыты. В настоящий момент при совместном рестрикционном анализе областей 25A-25B и 2AB-2AA дифференцируются бруцеллы видов *B. abortus* биоваров 1, 2, 4, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. vulpis*, *B. nosferati*

и *Brucella* sp. 2280 с неустановленной видовой принадлежностью. Отмечена ограниченность практического применения данного метода для определения таксономической принадлежности штаммов бруцелл.

Вариабельность нуклеотидных последовательностей генов *omp25* и *omp2a* оказалась значительно шире: 18 и 20 аллелей соответственно. При этом для большинства видов бруцелл и в ряде случаев для биоваров характерна уникальная последовательность данных генов. На основании совокупного анализа нуклеотидной последовательности этих генов возможно дифференцировать *B. abortus* биоваров 1, 2, 4, *B. abortus* биоваров 3, 5, 6, 9, *B. melitensis*, *B. suis* биовара 1, *B. suis* биовара 2, *B. suis* биовара 3, *B. suis* биовара 4, *B. suis* биовара 5, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* / *B. microti*, *B. inopinata*, *B. vulpis*, *B. nosferati* и отдельные *Brucella* spp., выделенные от амфибий.

В структурной вариабельности генов преобладающим было наличие единичных полиморфных нуклеотидов, часть из которых приводит к замене аминокислот и, как следствие, к изменению гидрофильности белка и его заряда. Делеции Δ562–597 (*omp25*) характерны для *B. ovis*, а Δ424–561 (*omp2a*) – для *B. abortus* 1, 2 и 4-го биоваров. Обе делеции образуются в результате гомологичной рекомбинации, поскольку участки генома ограничены восьмичленными прямыми повторами. Помимо этого, в гене *omp25* у *B. nosferati* и *B. vulpis* отмечены непротяженная делеция Δ103–108 п.н. и вставка триплета АСТ соответственно. Связь структурных изменений генов *omp25* и *omp2a* с определенными видами бруцелл, с одной стороны, и с циркуляцией этих бруцелл среди строго определенных животных – с другой, позволяет предположить, что такие изменения возникли в результате приспособления отдельных видов бруцелл к конкретным носителям. Интересным направлением продолжения данной работы может оказаться изучение функциональной активности как вариантов белков Omp2a с усеченными аминокислотными последовательностями *B. abortus* 1, 2 и 4-го биоваров, *B. suis* 2-го биовара и *B. ovis*, так и вариантов с измененной гидрофильностью, установление роли этих белков в переносе определенных ионов и питательных веществ.

Таким образом, нами изучена генетическая структура генов *omp25* и *omp2a* бруцелл, показано наличие мутаций: делеций, вставок и единичных полиморфных нуклеотидов, которые специфичны для видов, групп видов и в ряде случаев биоваров патогена. Установлены хорошие дифференцирующие способности определения аллельных вариантов генов *omp25* и *omp2a* для определения таксономического положения бруцелл. Представляется перспективным продолжение работы по изучению данных участков генома у коллекционных штаммов бруцелл, в том числе выделенных на территории Российской Федерации, и создание на основе полученных дан-

ных способа определения таксономического положения бруцелл.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. LPSN (List of Procarotic names with Standing in Nomenclature). [Электронный ресурс]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Brucella> (дата обращения 20.09.2023).
2. Eisenberg T., Hamann H.-P., Kaim U., Schlez K., Seeger H., Schauerte N., Melzer F., Tomaso H., Scholz H.C., Koylass M.S., Whatmore A.M., Zschöck M. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(10):3753–5. DOI: 10.1128/AEM.07509-11.
3. Fischer D., Lorenz N., Heuser W., Kämpfer P., Scholz H.C., Lierz M. Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 2012; 43(3):625–8. DOI: 10.1638/2011-0005R2.1.
4. Whatmore A.M., Dale E.-J., Stubberfield E., Muchowski J., Koylass M., Dawson C., Gopaul K.K., Perrett L.L., Jones M., Lawrie A. Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*). *JMM Case Rep.* 2015; 2(1). DOI: 10.1099/jmmcr.0.000017.
5. Soler-Lloréns P.F., Quance C.R., Lawhon S.D., Stuber T.P., Edwards J.F., Ficht T.A., Robbe-Austerman S., O'Callaghan D., Keriel A. A *Brucella* spp. isolate from a Pac-Man frog (*Ceratophrys ornata*) reveals characteristics departing from classical brucellae. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016; 6:116. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00116.
6. Hernández-Mora G., Chacón-Díaz C., Moreira-Soto A., Barrantes-Granados O., Suárez-Esquivel M., Viquez-Ruiz E., Barquero-Calvo E., Ruiz-Villalobos N., Hidalgo-Montelegre D., González-Barrientos R., Demeter E.A., Estrella-Morales J., Zúñiga-Pereira A.-M., Quesada-Gómez C., Chaves-Olarte E., Lomonte B., Guzmán-Verri C., Drexler J.F., Moreno E. Virulent *Brucella nosferati* infecting *Desmodus rotundus* has emerging potential due to the broad foraging range of its bat host for humans and wild and domestic animals. *mSphere*. 2023; 8(4):e0006123. DOI: 10.1128/msphere.00061-23.
7. Halling S.M., Peterson-Burch B.D., Bricker B.J., Zuerner R.L., Qing Z., Li L.L., Kapur V., Alt D.P., Olsen S.C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(8):2715–26. DOI: 10.1128/JB.187.8.2715-2726.2005.
8. Rajashekara G., Glasner J.D., Glover D.A., Splitter G.A. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15): 5040–51. DOI: 10.1128/JB.186.15.5040-5051.2004.
9. Mancilla M. The *Brucella* genomic islands. In: López-Goñi I., O'Callaghan D., editors. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*. Wymondham, UK: Caister Academic Press; 2012. P. 36–57. DOI: 10.21775/9781913652531.
10. Roop R.M. 2nd, Barton I.S., Hoppersberger D., Martin D.W. Uncovering the hidden credentials of *Brucella* virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2021; 85(1):e00021-19. DOI: 10.1128/MMBR.00021-19.
11. Cloeckaert A., Verger J.M., Grayon M., Grépinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology (Reading)*. 1995; 141(Pt. 9):2111–21. DOI: 10.1099/13500872-141-9-2111.
12. Vizcaino N., Cloeckaert A., Verger J., Grayon M., Fernández-Lago L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect.* 2000; 2(9):1089–100. DOI: 10.1016/s1286-4579(00)01263-6.
13. García-Yoldi D., Marín C.M., López-Goñi I. Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; 245(1):79–84. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.02.026.
14. De Massis F., Zilli K., Di Donato G., Nuvoloni R., Pelini S., Sacchini L., D'Alterio N., Di Giannatale E. Distribution of *Brucella* field strains isolated from livestock, wildlife populations, and humans in Italy from 2007 to 2015. *PLoS One*. 2019; 14(3):e0213689. DOI: 10.1371/journal.pone.0213689.
15. Осина Н.А., Касьян Ж.А., Касьян И.А., Ляшова О.Ю., Осин А.В. Определение видовой принадлежности штаммов бруцелл из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» с помощью амплификационных и рестрикционных технологий. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 4:69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-69-74.
16. Вершилова Н.А., Голубева А.А. Бруцеллез в СССР и пути его профилактики. М.: Медицина; 1970. 190 с.

References

1. LPSN (List of Procarotic names with Standing in Nomenclature). (Cited 20 Sept 2023). [Internet]. Available from: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Brucella>.
2. Eisenberg T., Hamann H.-P., Kaim U., Schlez K., Seeger H., Schauerte N., Melzer F., Tomaso H., Scholz H.C., Koylass M.S., Whatmore A.M., Zschöck M. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(10):3753–5. DOI: 10.1128/AEM.07509-11.
3. Fischer D., Lorenz N., Heuser W., Kämpfer P., Scholz H.C., Lierz M. Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 2012; 43(3):625–8. DOI: 10.1638/2011-0005R2.1.
4. Whatmore A.M., Dale E.-J., Stubberfield E., Muchowski J., Koylass M., Dawson C., Gopaul K.K., Perrett L.L., Jones M., Lawrie A. Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*). *JMM Case Rep.* 2015; 2(1). DOI: 10.1099/jmmcr.0.000017.
5. Soler-Lloréns P.F., Quance C.R., Lawhon S.D., Stuber T.P., Edwards J.F., Ficht T.A., Robbe-Austerman S., O'Callaghan D., Keriel A. A *Brucella* spp. isolate from a Pac-Man frog (*Ceratophrys ornata*) reveals characteristics departing from classical brucellae. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016; 6:116. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00116.
6. Hernández-Mora G., Chacón-Díaz C., Moreira-Soto A., Barrantes-Granados O., Suárez-Esquivel M., Viquez-Ruiz E., Barquero-Calvo E., Ruiz-Villalobos N., Hidalgo-Montelegre D., González-Barrientos R., Demeter E.A., Estrella-Morales J., Zúñiga-Pereira A.-M., Quesada-Gómez C., Chaves-Olarte E., Lomonte B., Guzmán-Verri C., Drexler J.F., Moreno E. Virulent *Brucella nosferati* infecting *Desmodus rotundus* has emerging potential due to the broad foraging range of its bat host for humans and wild and domestic animals. *mSphere*. 2023; 8(4):e0006123. DOI: 10.1128/msphere.00061-23.
7. Halling S.M., Peterson-Burch B.D., Bricker B.J., Zuerner R.L., Qing Z., Li L.L., Kapur V., Alt D.P., Olsen S.C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(8):2715–26. DOI: 10.1128/JB.187.8.2715-2726.2005.
8. Rajashekara G., Glasner J.D., Glover D.A., Splitter G.A. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15): 5040–51. DOI: 10.1128/JB.186.15.5040-5051.2004.
9. Mancilla M. The *Brucella* genomic islands. In: López-Goñi I., O'Callaghan D., editors. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*. Wymondham, UK: Caister Academic Press; 2012. P. 36–57. DOI: 10.21775/9781913652531.
10. Roop R.M. 2nd, Barton I.S., Hoppersberger D., Martin D.W. Uncovering the hidden credentials of *Brucella* virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2021; 85(1):e00021-19. DOI: 10.1128/MMBR.00021-19.
11. Cloeckaert A., Verger J.M., Grayon M., Grépinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology (Reading)*. 1995; 141(Pt. 9):2111–21. DOI: 10.1099/13500872-141-9-2111.
12. Vizcaino N., Cloeckaert A., Verger J., Grayon M., Fernández-Lago L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect.* 2000; 2(9):1089–100. DOI: 10.1016/s1286-4579(00)01263-6.
13. García-Yoldi D., Marín C.M., López-Goñi I. Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; 245(1):79–84. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.02.026.
14. De Massis F., Zilli K., Di Donato G., Nuvoloni R., Pelini S., Sacchini L., D'Alterio N., Di Giannatale E. Distribution of *Brucella* field strains isolated from livestock, wildlife populations, and humans in Italy from 2007 to 2015. *PLoS One*. 2019; 14(3):e0213689. DOI: 10.1371/journal.pone.0213689.
15. Osina N.A., Kas'yan Zh.A., Kas'yan I.A., Lyashova O.Yu., Osin A.V. [Determination of specific appurtenance of *Brucella* strains stored in the State Collection of Pathogenic Bacteria "Microbe", using amplification and restriction techniques]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (4):69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-69-74.
16. Vershilova N.A., Golubeva A.A. [Brucellosis in the USSR and Ways of its Prevention]. Moscow: "Medicine"; 1970. 190 p.

Authors:

Osina N.A., Boolgakova E.G., Osin A.V., Shvidenko I.G., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Осина Н.А., Булгакова Е.Г., Осин А.В., Швиденко И.Г., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-135-140

УДК 599:614.4(574)

В.А. Танитовский¹, А.А. Габбасов¹, В.В. Суров¹, В.Г. Мека-Меченко², З.З. Саякова², Н.С. Майканов¹

Численность и видовой состав грызунов и насекомоядных в населенных пунктах Западно-Казахстанской области, расположенных на энзоотичной по чуме территории

¹Филиал «Уральская противочумная станция» ННЦООИ, Уральск, Республика Казахстан; ²РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций имени Масгута Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Алматы, Республика Казахстан

Цель исследования – анализ численности, видового состава, расселения мышевидных грызунов и других мелких млекопитающих в населенных пунктах Западно-Казахстанской области за последние шесть лет и причин изменения численности в многолетнем аспекте. **Материалы и методы.** Для работы использованы данные, полученные сотрудниками филиала «Уральская противочумная станция» Республиканского государственного предприятия «Национальный научный центр особо опасных инфекций имени Масгута Айкимбаева» во время планового эпизоотологического обследования очагов чумы, расположенных на территории Западно-Казахстанской области. **Результаты и обсуждение.** На энзоотичной по чуме территории средняя годовая численность грызунов и насекомоядных в населенных пунктах Западно-Казахстанской области составила весной 5,1, осенью – 8,1 при 30,0 % заселенности поселковых объектов. В надворных постройках численность грызунов в три раза выше, чем в жилых домах, и составляет 11,5 (в жилых домах – 3,7). Общий видовой состав добытых в населенных пунктах мелких млекопитающих представлен семью видами, среди которых доминирует домовая мышь (97,5 %). На втором месте стоит белозубка малая (1,7 %). В степных очагах чумы наблюдается тенденция снижения численности грызунов (за 18 лет – в среднем на 22,0 %). В песчаном очаге произошел незначительный рост численности зверьков на 2,0 %.

Ключевые слова: энзоотичная территория, эпизоотологическое обследование, численность грызунов, индекс доминирования, *Mus musculus*, *Crocidura suaveolens*.

Корреспондирующий автор: Саякова Зауре Зинуровна, e-mail: Dzoo-2@nscedi.kz.

Для цитирования: Танитовский В.А., Габбасов А.А., Суров В.В., Мека-Меченко В.Г., Саякова З.З., Майканов Н.С. Численность и видовой состав грызунов и насекомоядных в населенных пунктах Западно-Казахстанской области, расположенных на энзоотичной по чуме территории. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:135–140. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-135-140

Поступила 10.01.2023. Принята к публ. 24.07.2023.

V.A. Tanitovsky¹, A.A. Gabbasov¹, V.V. Surov¹, V.G. Meka-Mechenko², Z.Z. Sayakova², N.S. Maikanov¹ Population and Species Composition of Rodents and Insectivores in Settlements of the West Kazakhstan Region Located in the Plague Enzootic Territory

¹Affiliated Branch of the National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections, Uralsk Plague Control Station, Uralsk, Republic of Kazakhstan;

²National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections named after Masgut Aikimbaev, Almaty, Republic of Kazakhstan

Abstract. The aim of the study was to analyze the abundance, species composition, dissemination of mouse-like rodents and other small mammals in the settlements of the West Kazakhstan Region over the past 6 years and the factors contributing to the change in the numbers in the long-term aspect. **Materials and methods.** We utilized the data obtained by employees of the Uralsk Plague Control Station, affiliated branch of the Republican State Enterprise “National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections named after Masgut Aikimbaev” during a scheduled epizootiological survey of plague foci located in the West Kazakhstan Region. **Results and discussion.** The average annual number of rodents and insectivores in the settlements on the plague-enzootic territory of the West Kazakhstan Region was 5.1 in spring season, 8.1 in autumn, with 30.0 % occupancy of the facilities. In outbuildings – 11.5 (residential buildings – 3.7). The general species composition of small mammals caught in the settlements was represented by seven species, among which the house mouse was a predominant one (97.5 %). The second place was occupied by the small shrew (1.7 %). There is a downward trend in the number of rodents in the steppe foci of plague (over 18 years – an average of 22.0 %). A slight increase in the number of animals by 2.0 % has been registered in the sandy focus.

Key words: enzootic territory, epizootiological survey, number of rodents, dominance index, *Mus musculus*, *Crocidura suaveolens*.

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

Funding: The results were obtained within the framework of program-targeted financing of the scientific and technological project “Development and scientific substantiation of public health technologies, biological safety to influence the prevention of particularly dangerous infectious diseases” (IRN of the program – BR11065207, source of funding – the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan).

Corresponding author: Zaure Z. Sayakova, e-mail: Dzoo-2@nscedi.kz.

Citation: Tanitovsky V.A., Gabbasov A.A., Surov V.V., Meka-Mechenko V.G., Sayakova Z.Z., Maikanov N.S. Population and Species Composition of Rodents and Insectivores in Settlements of the West Kazakhstan Region Located in the Plague Enzootic Territory. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:135–140. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-135-140

Received 10.01.2023. Accepted 24.07.2023.

Tanitovsky V.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0726-9905>
Gabbasov A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4564-3643>
Surov V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9804-3751>

Meka-Mechenko V.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4269-5977>
Sayakova Z.Z., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1107-6345>
Maikanov N.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7861-2849>

На территории Западно-Казахстанской области (ЗКО) находятся три природных очага чумы: Волго-Уральский степной (ВУС), Волго-Уральский песчаный (ВУП) и Урало-Уильский степной (УУС). На этой территории располагаются сотни населенных пунктов (поселки, зимовки). Противочумная служба всегда уделяла особое внимание заселенности поселковых объектов мышевидными грызунами и борьбе с ними, так как известны многочисленные случаи заболевания людей чумой от мышевидных грызунов, обитающих в жилье человека. Еще в 1915 г. И.И. Тихомиров установил, что «передача возбудителя чумы от больных мышей к человеку происходит через блох» [1], позже он доказал, что эпидемические вспышки, связанные с синантропными грызунами, обычно приурочены к осенне-зимнему периоду и обусловлены миграцией больных зверьков в жилье человека, стога сена, с последующей передачей возбудителя чумы человеку [2]. Потенциальная опасность возникновения эпидемических осложнений значительно возрастает в периоды высокой численности мышевидных грызунов и сезонной миграционной активности [3]. Мыши вступают в контакт с основными носителями, часто используя чужие норы, и заражаются. Важное эпидемиологическое значение они приобретают благодаря экологическим особенностям, образуя связующее звено между человеческими поселениями и природными очагами. Чем дальше на север, тем выше степень синантропности домовых мышей. В пустынных и полупустынных районах они могут жить в природе круглый год. Но и здесь нередки случаи, когда даже летом они предпочитают склады, магазины или жилища человека, богатые кормом. В лесополосной зоне домовые мыши в холодное время года спасаются от бескормицы и осадков в постройках человека, а теплое проводят на полях зерновых культур или в других не менее кормных местах [4]. Уральская противочумная станция – самая северная в Республике Казахстан, поэтому сезонные миграции домовых мышей на территории ее деятельности наиболее выражены и имеют существенное эпидемическое значение.

В природных очагах чумы домовые мыши являются второстепенными носителями и вовлекаются в эпизоотии только при их повышенной численности. В XX в. эпизоотии чумы на домовых мышах регистрировались неоднократно, как на обследуемой территории, так и на прилегающих к ней [5–9]. А.И. Дятлов и соавт. по результатам эпизоотологического обследования 1979–1986 гг. в Приморских песках Прикаспийского Северо-Западного природного очага чумы даже причислили домовую мышь к категории основных носителей (наряду с малыми песчанками) в этом регионе [10]. Нередко заболе-

вшие чумой грызуны отлавливались и в закрытых станциях, например во время эпизоотии чумы в междуречье Урала и Эмбы (1956–1963 гг.), в 1958 г. она проникла в популяцию домовых мышей в низовьях Урала, где в 89 пунктах было выделено 236 культур возбудителя чумы [11].

Эпизоотологическое исследование грызунов и других мелких млекопитающих из населенных пунктов и регулирование их численности – это важный и необходимый элемент профилактических противоэпидемических мероприятий в очагах чумы и других природно-очаговых инфекций.

Тема эта очень актуальна и работы, касающиеся проникновения мышевидных грызунов в жилье человека в Казахстане, имеются [12–20], но их недостаточно.

Целью данной работы явился анализ численности, видового состава, расселения мышевидных грызунов и других мелких млекопитающих в населенных пунктах Западно-Казахстанской области, расположенных на энзоотичной по чуме территории, за последние шесть лет и причин изменения численности в многолетнем аспекте.

Материалы и методы

Для работы использованы данные, полученные сотрудниками филиала «Уральская противочумная станция» РГП на ПХВ «ННЦООИ им. М. Айкимбаева» во время планового эпизоотологического обследования очагов чумы, расположенных на территории Западно-Казахстанской области. С этой целью в поселковых объектах (жилые дома, надворные постройки) различных населенных пунктов ежегодно выставляется около 17,0 тыс. давилок Геро (ловушко-ночей) с использованием стандартной приманки (хлеб с подсолнечным маслом). Вылов зверьков и определение их численности проводились в соответствии с действующими инструктивными документами. Критерием численности мышевидных грызунов служит их процент попадания на 100 давилок. Основные объемы обследовательских работ выполнены в весенний (апрель – май) и осенний (октябрь – ноябрь) периоды. В работе рассмотрена информация по численности и видовому составу мышевидных грызунов и других мелких млекопитающих, добытых в населенных пунктах за последние шесть лет (2017–2022 гг.).

Результаты и обсуждение

За указанное время (2017–2022 гг.) обследованием на заселенность населенных пунктов мышевидными грызунами охвачено 13600 поселковых объектов общей площадью около 833,0 тыс. м²,

выставлено 85,0 тыс. давилок Геро, добыто 7025 млекопитающих.

По полученным данным, весной в ВУС общая численность грызунов в населенных пунктах составила 6,4 при зараженности поселковых объектов, равной 26,4 %. Осенью численность в среднем возрастает приблизительно на 30,0 % – соответственно до 8,3 грызуна и 34,1 %. При этом наблюдаются существенные различия в заселенности грызунами жилых и надворных построек. Более охотно заселяются надворные постройки. Весной в жилых домах численность зверьков была равна 3,2 при 19,6 % зараженности объектов. В надворных постройках в это время показатель составил 9,6 при 33,1 %, что в 3 раза выше. Осенью соответствующие данные составляли: в жилых домах – 4,8 грызуна и 28,5 %; в надворных постройках – 11,7 и 39,6 %, что в 2,5 раза больше (табл. 1).

В УУС динамика численности мышевидных грызунов в населенных пунктах близка по своим параметрам к данным по ВУС (табл. 1).

В ВУП в отношении весенней и осенней численности грызунов в населенных пунктах наблюдается несколько иная картина. Весной общая численность

млекопитающих составила 9,2 при 29,3 % зараженности объектов. Осенью численность зверьков сократилась до 8,3 при 31,8 % зараженности объектов, т.е. от весны к осени произошло сокращение численности на 10,0 %. При этом весной в жилых домах численность зверьков была равна 2,0 при 15,9 % зараженности объектов. В надворных постройках в это время показатели составили соответственно 16,3 и 42,7 %, что в 8 раз выше. Осенью соответствующие данные составляли: в жилых домах – 4,1 и 26,5 %; в надворных постройках – 12,4 и 37,0 %, что в 3 раза больше.

Снижение численности грызунов от весны к осени или, наоборот, увеличение от осени к весне можно объяснить довольно жесткими летними условиями пустынного климата в песках, ухудшившимися за последнее время [21], и предпочтением мелких млекопитающих размножаться в холодное время года. Такое явление наблюдается в этом очаге у полуденной песчанки [22] и других мышевидных грызунов [23].

Общий видовой состав добытых в населенных пунктах мелких млекопитающих представлен семью видами: мышь домовая – *Mus musculus* Linnaeus, 1758;

Таблица 1 / Table 1

Численность грызунов и насекомоядных в населенных пунктах ЗКО, расположенных в очагах чумы, с 2017 по 2022 г.
The number of rodents and insectivores in settlements of the West Kazakhstan Region located in plague foci, between 2017 and 2022

Оаги чумы Plague foci	Характер построек Type of facility	Весна Spring					Осень Autumn				
		Количество построек Number of buildings	С грызунами Occupied by rodents	Заселенных построек, % Populated buildings %	Всего грызунов Total number of rodents	Процент попадания Percentage of captures per 100 traps	Количество построек Number of buildings	С грызунами Occupied by rodents	Заселенных построек, % Populated buildings %	Всего грызунов Total number of rodents	Процент попадания Percentage of captures per 100 traps
ВУС Volga-Ural steppe focus	Жилые дома Residential buildings	991	194	19,6	270	3,2	1233	351	28,5	569	4,8
	Надворные постройки Outbuildings	2348	777	33,1	114	9,6	2647	1047	39,6	1757	11,7
	<i>Всего / Total</i>	3339	971	26,4	1184	6,4	3880	5278	34,1	2326	8,3
ВУП Volga-Ural sandy focus	Жилые дома Residential buildings	221	35	15,9	43	2,0	208	55	26,5	81	4,1
	Надворные постройки Outbuildings	520	222	42,7	342	16,3	506	187	37,0	363	12,4
	<i>Всего / Total</i>	741	257	29,3	385	9,2	714	242	31,8	444	8,3
УУС Ural-Uilsky steppe focus	Жилые дома Residential buildings	674	118	17,5	171	2,9	957	269	28,1	473	5,0
	Надворные постройки Outbuildings	1385	390	28,2	568	7,3	1911	749	39,2	1354	11,2
	<i>Всего / Total</i>	2059	508	22,9	739	5,1	2868	1018	33,6	1827	8,1
<i>Всего Total</i>	Жилые дома Residential buildings	1886	347	17,7	484	2,7	2398	675	27,7	1123	4,7
	Надворные постройки Outbuildings	4253	1389	34,7	2024	11,1	5064	1983	38,6	3474	11,8
	<i>Всего / Total</i>	6139	1756	26,2	2508	6,9	7462	2658	33,2	4597	8,3

малая лесная мышь – *Apodemus uralensis* Pallas, 1811; обыкновенная полевка – *Microtus arvalis* Pallas, 1779; общественная полевка – *M. socialis* Pallas, 1773; полуденная песчанка – *Meriones meridianus* Pallas, 1773; гребенщикова песчанка – *M. tamariscinus* Pallas, 1773; малая белозубка – *Crociodura suaveolens* Pallas, 1811. В ВУС и ВУП добыто по четыре вида, а в УУС – шесть видов млекопитающих. Во всех очагах в выловах зверьков по численности преобладала домовая мышь: индекс доминирования (ИД) – 97,5 %. Значительно реже отлавливалась белозубка малая (ИД – 1,7 % [1,3–3,5 %]) и еще реже полевка обыкновенная (0,43 % [0,0–0,7 %]) (табл. 2). Дополнительно можно отметить добычу в январе 2017 г. в УУС (Сырымский район) в надворной постройке степного хора.

Для определения тенденции изменения численности мышевидных грызунов в населенных пунктах в многолетнем аспекте проведено сравнение годовой численности зверьков с данными 19-летней давности (2004–2008 гг.).

Для различных очагов чумы эти изменения оказались неравнозначными. Для ВУС и УУС произошло сокращение численности зверьков соответственно на 21,0 и 24,0 %. В то же время для ВУП наблюдается обратная тенденция: рост численности мышевидных грызунов на 2,0 %.

Причины разнонаправленных изменений численности мышевидных грызунов в населенных пунктах на территории различных очагов чумы не вполне ясны. Предположительно, населенные пункты, расположенные в песчаном очаге, более приближены к местам обитания домовых мышей и других мелких млекопитающих, живущих в открытых стациях (заросли тамарикса, кумарчика, песчаной полыни), что способствует их миграции в поселковые объекты. В степных очагах вокруг населенных пунктов почва обычно выбита скотом, и во время миграции зверькам приходится преодолевать большие

расстояния на открытой, без укрытий, территории. При этом в связи с потеплением климата ситуация с опустыниванием территории усиливается, что отрицательно влияет на миграционную активность мышевидных грызунов в направлении поселковых объектов. В степи более благоприятные условия для миграции грызунов в постройки людей складываются в местах, где населенный пункт расположен вблизи водоема (озера, реки). При этом численность мышевидных грызунов во влажных стациях обычно выше, чем в открытой степи.

Таким образом, за последние шесть лет (2017–2022 гг.) на энзоотичной по чуме территории численность мышевидных грызунов в населенных пунктах Западно-Казахстанской области в среднем составила весной 5,1 % попадания, а осенью – 8,1 % при 30,0 % заселенности поселковых объектов. Более охотно заселяются надворные постройки. Численность грызунов в надворных постройках в 3,0 раза выше, чем в жилых домах, и составляет 11,5 % (в жилых домах – 3,7 %).

Видовой состав добытых в населенных пунктах мелких млекопитающих представлен семью видами, среди которых доминирует домовая мышь (97,5 %), затем белозубка малая (1,7 %) и полевка обыкновенная (0,43 %).

В степных очагах чумы наблюдается тенденция снижения численности грызунов (за 18 лет – в среднем на 22,0 %). В песчаном очаге произошел значительный рост численности зверьков (на 2,0 %).

Несмотря на общее снижение численности грызунов, осенью в поселковых постройках во всех очагах чумы процент попадания остается достаточно высоким. Поэтому говорить о том, что численность мышевидных грызунов значительно снизилась и не представляет потенциальной эпидемической опасности для населения, преждевременно. При необходимости (по эпидемиологическим показаниям) следует проводить поселковую дератизацию.

Таблица 2 / Table 2

Видовой состав грызунов и насекомоядных, добытых в населенных пунктах ЗКО, расположенных в очагах чумы, с 2017 по 2022 г.
Species composition of rodents and insectivores caught in settlements of the West Kazakhstan Region located in plague foci, between 2017 and 2022

Виды млекопитающих Mammalian species	Очаг чумы Plague focus			Всего Total
	ВУС Volga-Ural steppe	ВУП Volga-Ural sandy	УУС Ural-Uilsky steppe	
<i>Mus musculus</i> , всего (ИД, %) / total (DI*, %)	3634 (97,97)	718 (96,08)	2495 (97,22)	6847 (97,05)
<i>Apodemus uralensis</i> , всего (ИД, %) / total (DI, %)	1 (0,03)	–	11 (0,4)	12 (0,17)
<i>Microtus arvalis</i> , всего (ИД, %) / total (DI, %)	27 (0,7)	–	4 (0,2)	31 (0,43)
<i>Microtus socialis</i> , всего (ИД, %) / total (DI, %)	–	–	9 (0,3)	9 (0,12)
<i>Meriones meridianus</i> , всего (ИД, %) / total (DI, %)	–	3 (0,4)	–	3 (0,04)
<i>Meriones tamariscinus</i> , всего (ИД, %) / total (DI, %)	–	1 (0,2)	2 (0,08)	3 (0,04)
<i>Crociodura suaveolens</i> , всего (ИД, %) / total (DI, %)	49 (0,7)	26 (3,5)	45 (1,8)	120 (1,7)
Количество видов, всего / number of species, total	4	4	6	7
Количество особей, всего / number of specimens, total	3711	748	2566	7025

Note: * DI – Dominance index.

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

Финансирование. Результаты получены в рамках программно-целевого финансирования НТП «Разработка и научное обоснование технологий общественного здравоохранения, биологической безопасности для воздействия на профилактику особо опасных инфекционных заболеваний» (ИРН программы – BR11065207, источник финансирования – Министерство здравоохранения Республики Казахстан).

Список литературы

1. Кереев Н.И. Природноочаговые болезни человека в Казахстане: (Вопросы географического распространения, региональные особенности эпидемиологии, профилактики и ликвидации). Алма-Ата: Казахстан; 1965. 310 с.
2. Тихомиров И.И. Эпидемиологическая связь зимних чумных эпидемий в Киргизских степях с мышиными чумными эпизоотиями. В кн.: Заболотный Д.К., Омелянский В.Л., редакторы. Чума на юго-востоке СССР и причины ее эндемичности. Л.; 1926. С. 168–175.
3. Шейкина М.В. Роль домашних мышей в поддержании сезонного контакта между человеком и грызунами песков. *Вестник микробиологии, эпидемиологии и паразитологии*. 1940; 19(2):303–19.
4. Котенкова Е.В., Мешкова Н.Н., Шутова М.И. О крысах и мышах. М.: Наука; 1989. 176 с.
5. Фенюк Б.К., Флегонтова А.А., Ящук А.П. Эпизоотия чумы на мышевидных грызунах в Волго-Ахтубинской пойме в 1937–1938 гг. В кн.: Берлин А.Л., Смирнов В.П., редакторы. Грызуны и борьба с ними: Сборник статей. Саратов; 1960. Вып. 6. С. 154–71.
6. Фенюк Б.К., Осолинкер Б.Е., Лалазаров А.А. Эпизоотия чумы среди домашних мышей в низовьях реки Урала в 1958–1959 гг. В кн.: Николаев Н.И., редактор. Особо опасные и природноочаговые инфекции: Сборник науч. работ противочумных учреждений. М.: Медгиз; 1962. С. 4–21.
7. Настюков Н.З., Дмитрюк Г.Н., Гельбейн М.Н., Леснев Г.С. Чума у домашних мышей на Западном Устьорте. В кн.: Материалы 7-й научной конференции противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана. Алма-Ата; 1971. С. 227–8.
8. Кулик И.Л. *Mus musculus* Linnaeus, 1758 – домовая мышь. В кн.: Кучерук В.В., редактор. Медицинская териология. М.: Наука; 1979. С. 204–19.
9. Шилов М.Н., Варшавский С.Н., Бурделов Л.А., Жубаназаров И.Ж., Красюков В.Ф., Функ В.Г., Еремицкий Н.Я., Басимбеков О.Б. Участие домовой мыши – *Mus musculus* (Rodentia, Muridae) в эпизоотиях чумы в Северном Приаралье. *Зоологический журнал*. 1992; 71(3):111–7.
10. Дятлов А.И., Антоненко А.Д., Гризбековский Г.М., Лабунец Н.Ф. Природная очаговость чумы на Кавказе. Ставрополь; 2001. 345 с.
11. Постников Г.Б. Течение эпизоотии чумы в междуречье Урала и Эмбы. В кн.: Материалы IV научной конференции по природной очаговости и профилактике чумы. Алма-Ата: Кайнар; 1965. С. 207–9.
12. Фадеев Г.С. Распределение мышевидных грызунов в культурном ландшафте центральной части Илийской котловины. В кн.: Материалы IV научной конференции по природной очаговости и профилактике чумы. Алма-Ата: Кайнар; 1965. С. 270.
13. Агеев В.С., Трофимов В.И. Многолетние колебания численности домашних мышей в низовьях Урала. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1976; 5:31–4.
14. Слудский А.А., Бекенов А., Борисенко В.А., Грачев Ю.А., Исмагилов М.И., Капитонов В.И., Страутман Е.И., Федосенко А.К., Шубин И.Г. Млекопитающие Казахстана. Алма-Ата: Наука КазССР; 1977. Т. 1, ч. 2. 536 с.
15. Бурделов Л.А., Жубаназаров И.Ж., Картушин Е.П., Руденчик Н.Ф., Тен В.Ф. Некоторые особенности проникновения несинантропных млекопитающих Приаралья в человеческие жилища. *Экология*. 1985; 6:65–8.
16. Бурделов Л.А., Жубаназаров И.Ж., Картушин Е.П., Руденчик Н.Ф., Тен В.Ф. Домовая мышь *Mus musculus* (Rodentia, Muridae) в населенных пунктах Приаралья. *Зоологический журнал*. 1986; 65(12):1875–80.
17. Бурделов Л.А., Бурделов А.С., Степанов В.М., Руденчик Н.Ф., Пак И.Г., Байтанаев О.А., Стогов В.И., Мырзабеков Ж.М., Бурделов В.А., Шашков В.Д., Жубаназаров И.Ж., Алашбаев М.А., Бурделов С.А., Гарбузов Б.В., Кожамбетов К.К. Позвоночные животные в человеческом жилье Западного, Южного и Юго-Восточного Казахстана (по результатам анкетирования). *Зоологический журнал*. 1990; 69(5):108–12.
18. Бурделов Л.А., Бурделов А.С., Степанов В.М., Руденчик Н.Ф., Пак И.Г., Байтанаев О.А., Стогов В.И., Мырзабеков Ж.М., Бурделов В.А., Шашков В.Д., Жубаназаров И.Ж., Алашбаев М.А., Бурделов С.А., Гарбузов Б.В., Кожамбетов К.К., Новикова В.С. Некоторые особенности заселения домовыми мышами построек человека (на примере Казахстана). *Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отделение биологическое*. 1990; 95(5):25–30.
19. Бурделов Л.А., Жубаназаров И.Ж., Свимонишвили В.Н. О возможности завоза зараженных чумой домашних мышей и землероек в населенные пункты при заготовке сена. В кн.: Организация эпиднадзора при чуме и меры ее профилактики: Материалы межгосударственной научно-практической конференции. Ч. 1. Алма-Ата; 1992. С. 12–4.
20. Сараев Ф.А., Хамзин Т.Х., Калдыбаев Т.Е., Тулешов И.У., Зинуллин Б.С., Кожантаев Г., Абиляев Т., Тегисбаева А.У. О вспышке численности домашних мышей в пойме реки Урал в 2017 году. В кн.: Материалы Западно-Казахстанской научно-практической конференции «Эпидемиологический надзор за природно-очаговыми инфекциями. Экология носителей и переносчиков. Биобезопасность». Уральск; 2018. С. 64–7.
21. Окулова Н.М., Бидашко Ф.Г., Гражданов А.К. Об изменениях сообществ млекопитающих Западного Казахстана в связи с многолетними изменениями абиотических условий. *Поволжский экологический журнал*. 2005; 3:241–54.
22. Танитовский В.А., Таббасов А.А., Айтимова А.Г., Канаткалиева Ж.А. Влияние потепления климата на фауну малых песчанок в Волго-Уральском песчаном очаге чумы. *Особо опасные инфекции и биологическая безопасность*. 2021; 1(1):40–3.
23. Окулова Н.М., Гражданов А.К., Неронов В.В. Структура и динамика сообществ млекопитающих Западного Казахстана. М.: Товарищество научных изданий КМК; 2016. 920 с.

References

1. Kereev N.I. [Natural-Focal Human Diseases in Kazakhstan: (Issues of Geographical Distribution, Regional Features of Epidemiology, Prevention and Eradication)]. Alma-Ata: Kazakhstan; 1965. 310 p.
2. Tikhomirov I.I. [Epidemiological connection between winter plague epidemics in the Kirghiz steppes and mouse plague epizootics]. In: Zabolotny D.K., Omelyansky V.L., editors. [Plague in the South-East of the USSR and Causes of its Endemicity]. Leningrad; 1926. P. 168–75.
3. Sheikina M.V. [The role of house mice in maintaining seasonal contact between humans and sand rodents]. *Vestnik Mikrobiologii, Epidemiologii i Parazitologii* [Bulletin of Microbiology, Epidemiology and Parasitology]. 1940; 19(2):303–19.
4. Kotenkova E.V., Meshkova N.N., Shutova M.I. [On Rats and Mice]. Moscow: "Nauka"; 1989. 176 p.
5. Fenyuk B.K., Flegontova A.A., Yashchuk A.P. [Epizootic of plague in mouse-like rodents in the Volga-Akhtuba floodplain in 1937–1938]. In: Berlin A.L., Smirnov V.P., editors. [Rodents and their Control: Collection of Papers]. Saratov; 1960. Iss. 6. P. 154–71.
6. Fenyuk B.K., Osolinker B.E., Lalazarov A.A. [Epizooty of plague among house mice in the lower reaches of the Ural River in 1958–1959]. In: Nikolaev N.I., editor. [Particularly Dangerous and Natural-Focal Infections: Collection of Scientific Works of Anti-Plague Institutions]. Moscow: "Medgiz"; 1962. P. 4–21.
7. Nastukov N.Z., Dmitryuk G.N., Gel'bein M.N., Lesnev G.S. [Plague in house mice in Western Ustyurt]. In: [Proceedings of the 7th Scientific Conference of Anti-Plague Institutions of Central Asia and Kazakhstan]. Alma-Ata; 1971. P. 227–8.
8. Kulik I.L. [*Mus musculus* Linnaeus, 1758 – house mouse]. In: Kucheruk V.V., editor. [Medical Mammalogy]. Moscow: "Nauka"; 1979. P. 204–19.
9. Shilov M.N., Varshavsky S.N., Burdelov L.A., Zhubanazarov I.Zh., Krasnyukov V.F., Funk V.G., Eremitzky N.Ya., Basimbekov O.B. [Participation of house mouse, *Mus musculus* (Rodentia, Muridae), in plague epizootics in the northern Aral Sea region]. *Zoologicheskyy Zhurnal* [Zoological Journal]. 1992; 71(3):111–7.
10. Dyatlov A.I., Antonenko A.D., Grizhebovsky G.M., Labunets N.F. [Natural Focality of Plague in the Caucasus]. Stavropol; 2001. 345 p.
11. Postnikov G.B. [The Course of the Plague Epizootic in the Interfluvium of Ural and Emba Rivers. Proceedings of the IV Scientific Conference on Natural Focality and Prevention of Plague]. Alma-Ata: "Kainar"; 1965. P. 207–9.
12. Fadeev G.S. [Distribution of mouse-like rodents in the cultural landscape of the central part of the Ili basin]. In: [Proceedings of the IV Scientific Conference on Natural Focality and Prevention of Plague]. Alma-Ata: "Kainar"; 1965. P. 270.
13. Ageev V.S., Trofimov V.I. [Long-term fluctuations in the number of house mice in the lower reaches of the Ural River].

Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 1976; (5):31–4.

14. Sludsky A.A., Bekenov A., Borismenko V.A., Grachev Yu.A., Ismagilov M.I., Kapitonov V.I., Strautman E.I., Fedosenko A.K., Shubin I.G. [Mammals of Kazakhstan]. Alma-Ata; 1977. Vol. 1, Part 2. 536 p.

15. Burdelov L.A., Zhubanazarov I.Zh., Kartushin E.P., Rudenchik N.F., Ten V.F. [Some features of entry of non-synanthropic mammals of the Aral Sea region into human dwellings]. *Ekologiya [Ecology]*. 1985; (6):65–8.

16. Burdelov L.A., Zhubanazarov I.Zh., Kartushin E.P., Rudenchik N.F., Ten V.F. [House mouse *Mus musculus* (Rodentia, Muridae) in the settlements of the Aral Sea region]. *Zoologicheskyy Zhurnal [Zoological Journal]*. 1986; 65(12):1875–80.

17. Burdelov L.A., Burdelov A.S., Stepanov V.M., Rudenchik N.F., Pak I.G., Baitanaev O.A., Stogov V.I., Myrzabekov Zh.M., Burdelov V.A., Shashkov V.D., Zhubanazarov I.Zh., Alashbaev M.A., Burdelov S.A., Garbuzov B.V., Kozhakhmetov K.K. [Vertebrate animals in human dwellings of Western, Southern and South-Eastern Kazakhstan (according to the results of the survey)]. *Zoologicheskyy Zhurnal [Zoological Journal]*. 1990; 69(5):108–12.

18. Burdelov L.A., Burdelov A.S., Stepanov V.M., Rudenchik N.F., Pak I.G., Baitanaev O.A., Stogov V.I., Myrzabekov Zh.M., Burdelov V.A., Shashkov V.D., Zhubanazarov I.Zh., Alashbaev M.A., Burdelov S.A., Garbuzov B.V., Kozhakhmetov K.K., Novikova V.S. [Some features of occupancy of human buildings by house mice (by the example of Kazakhstan)]. *[Bulletin of the Moscow Society of Naturalists, Department of Biology]*. 1990; 95(5):25–30.

19. Burdelov L.A., Zhubanazarov I.Zh., Svimonishvili V.N. [On the possibility of importation of plague-infected house mice and shrews into settlements while making hay]. In: [Organization of Epidemiological Surveillance in Case of Plague and Measures for its Prevention. Proceedings of the Interstate Scientific and Practical Conference. Part I]. Alma-Ata; 1992. P. 12–4.

20. Saraev F.A., Khamzin T.Kh., Kaldybaev T.E., Tuleshov I.U., Zinullin B.S., Kozhantaev G., Abiltay T., Tegisbaeva A.U. [Regarding the spike in the house mice population in the floodplain

of the Ural River in 2017]. In: [Proceedings of the West Kazakhstan Scientific and Practical Conference “Epidemiological surveillance over natural-focal infections. Ecology of carriers and vectors. Biosecurity”]. Uralsk; 2018. P. 64–7.

21. Okulova N.M., Bidashko F.G., Grazhdanov A.K. [On changes in the communities of mammals in Western Kazakhstan due to long-term changes in abiotic conditions]. *Povolzhsky Ekologicheskyy Zhurnal [Volga Ecological Journal]*. 2005; (3):241–54.

22. Tanitovsky V.A., Gabbasov A.A., Aitimova A.G., Kanatkalieva Zh.A. [Influence of climate warming on the fauna of small gerbils in the Volga-Ural sandy focus of plague]. *Osobo Opasnye Infektsii i Biologicheskaya Bezopasnost' [Particularly Dangerous Infections and Biological Safety]*. 2021; 1(1):40–3.

23. Okulova N.M., Grazhdanov A.K., Neronov V.V. [Structure and Dynamics of Mammalian Communities in Western Kazakhstan]. Moscow: “Fellowship of scientific publications KMK”; 2016. 920 p.

Authors:

Tanitovsky V.A., Gabbasov A.A., Surov V.V., Maikanov N.S. Affiliated Branch of the National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections, Uralsk Plague Control Station. 36/1, Chapaeva St., Uralsk, 090000, Republic of Kazakhstan. E-mail: ural-aps2@nscedi.kz.

Meka-Mechenko V.G., Sayakova Z.Z. National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections named after Masgut Aikimbaev. 14, Zhakhanger St., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan. E-mail: nnscedi-1@nscedi.kz.

Об авторах:

Танитовский В.А., Габбасов А.А., Суоров В.В., Майканов Н.С. Филиал «Уральская противочумная станция» ННЦООИ. Республика Казахстан, 090000, Уральск, ул. Чапаева, 36/1. E-mail: ural-aps2@nscedi.kz.

Мека-Меченко В.Г., Саякова З.З. Национальный научный центр особо опасных инфекций имени Масгута Айкимбаева Министерства здравоохранения Республики Казахстан. Республика Казахстан, 050054, Алматы, ул. Жахангер, 14. E-mail: nnscedi-1@nscedi.kz.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-141-148

УДК 616.98:578.834.1

В.П. Топорков

Пандемия COVID-19: продолжительность и эпидемиологический прогноз*ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация*

Всемирная организация здравоохранения определила COVID-19 как пандемию 11 марта 2020 г. А в марте 2022 г., т.е. примерно через два года, зарегистрировано глобальное доминирование филогенетического варианта SARS-CoV-2 омикрон с обусловленным им более легким клиническим течением болезни, в связи с чем сделан эпидемиологический прогноз о наступлении периода спада пандемии. **Целью** данной работы является определение продолжительности и возможностей прогнозирования пандемии COVID-19 на основе эпидемиологической оценки ее динамики в контексте волнообразного хода, фазового характера, эпидемиологической значимости филогенетических преобразований возбудителя. Проанализированы материалы глобального ресурса в сети Интернет о ежедневных случаях заражения / летальных исходах COVID-19, результатах филогенетических исследований возбудителя и их интерпретации с помощью эпидемиологического метода. Анализ динамики пандемии COVID-19 в мире выявил ее принадлежность к типичному в эпидемиологии варианту пандемий (эпидемий) со свойственными ему волнами, длящимися месяцами, не совпадающими с годовыми солнечными циклами. На начало марта 2023 г. зарегистрировано 7 волн, из них 1–4-я волны – эпидемическая фаза, обусловленная последовательным доминированием штаммов ухань и дельта, 6–7-я волны – постэпидемическая фаза. Волны варьировали по продолжительности от 4 до 7 мес. (M – 4,6 мес.) и по амплитуде от 307205 до 4082344 (M – 1331389,14) пиковых значений числа зараженных и соответственно умерших – от 2997 до 20702 (M – 10506) человек. Постэпидемическая фаза характеризовалась устойчивой тенденцией количественного уменьшения SARS-CoV-2 омикрон в виде ундулирующей динамики с неуклонно снижающейся амплитудой волн числа зараженных на фоне резкого снижения числа летальных исходов по сравнению с эпидемической фазой. Продолжение этой тенденции ожидается в виде еще двух небольших по амплитуде волн (8-я и 9-я) общей продолжительностью около 10 мес., завершение постэпидемической фазы прогнозируется в первом полугодии 2024 г. Данные о фазовом характере пандемии, детерминируемом геномными изменениями возбудителя, необходимы для формирования готовности к будущим пандемиям.

Ключевые слова: пандемия COVID-19, филогенетические технологии, фазы пандемии, эпидемиологический прогноз.

Корреспондирующий автор: Топорков Владимир Петрович, e-mail: rusgapi@microbe.ru.

Для цитирования: Топорков В.П. Пандемия COVID-19: продолжительность и эпидемиологический прогноз. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:141–148. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-141-148

Поступила 21.04.2023. Отправлена на доработку 12.06.2023. Принята к публ. 11.09.2023.

V.P. Toporkov**COVID-19 Pandemic: Duration and Epidemiological Forecast***Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation*

Abstract. The World Health Organization declared COVID-19 a pandemic on March 11, 2020. While in March 2022, i.e. approximately two years later, the global dominance of the phylogenetic variant of SARS-CoV-2 Omicron with its associated milder clinical course of the disease was registered, and therefore an epidemiological forecast was made about the onset of a period of decline in the pandemic. **The aim** of this work was to determine the duration and possibility of predicting the COVID-19 pandemic based on an epidemiological assessment of its dynamics in the context of the wave-like course, phase nature, and epidemiological significance of the phylogenetic transformations of the pathogen. Materials from a global source on the Internet about daily cases of infection/deaths of COVID-19, the results of phylogenetic studies of the pathogen and their interpretation using the epidemiological method were analyzed. The evaluation of the COVID-19 pandemic dynamics in the world revealed that it is a typical epidemiological variant of pandemics (epidemics) with its characteristic waves that last for months and do not coincide with the annual solar cycles. As of early March 2023, 7 waves were registered, of which the 1st–4th waves are the epidemic phase, caused by the consistent dominance of the Wuhan and Delta strains, the 6th–7th waves are the post-epidemic phase. The waves varied in duration from 4 to 7 months (M – 4.6 months) and in amplitude from 307205 to 4082344 (M – 1331389.14) peak values of the number of the infected and deaths – from 2997 to 20702 (M – 10506), accordingly. The post-epidemic phase was characterized by a steady trend of quantitative decrease in SARS-CoV-2 Omicron in the form of undulating dynamics with steadily decreasing amplitude of the waves of the number of infected people against the background of a sharp decrease in the number of lethal outcomes compared to the epidemic phase. The continuation of this trend is expected in the form of two more waves of small amplitude (8th and 9th) with a total duration of about 10 months; the completion of the post-epidemic phase is predicted in the first half of 2024. Data on the phase nature of the pandemic, determined by genomic changes in the pathogen, are necessary to be prepared for future pandemics.

Key words: COVID-19 pandemic, phylogenetic technologies, phases of the pandemic, epidemiological forecast.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Vladimir P. Toporkov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Toporkov V.P. COVID-19 Pandemic: Duration and Epidemiological Forecast. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:141–148. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-141-148

Received 21.04.2023. *Revised* 12.06.2023. *Accepted* 11.09.2023.

Toporkov V.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9512-7415>

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определила COVID-19 как пандемию 11 марта 2020 г. [1]. А в марте 2022 г., т.е. примерно через два года, в мире зарегистрировано глобальное доминирование филогенетического варианта SARS-CoV-2 омикрон, которому предшествовало его быстрое распространение на юге Африки [2]. С глобальным доминированием штамма омикрон связано более легкое клиническое течение болезни, трактуемое в эпидемиологии как признак наступления периода спада пандемии – постэпидемической фазы [3–5]. В связи с этим сделан эпидемиологический прогноз, суть которого состояла в констатации завершения эпидемической фазы пандемии, обусловленной последовательным глобальным доминированием циркуляции штаммов уханьский и дельта, и прогнозировании наступления периода спада пандемии, т.е. неуклонного улучшения эпидемиологической обстановки в мире, связанного с глобальным доминированием штамма омикрон. Наши данные о прогнозировании спада пандемии COVID-19, детерминируемого филогенетическими изменениями возбудителя SARS-CoV-2, опубликованы в тезисном формате в сборнике материалов III Международной научно-практической конференции по вопросам противодействия новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям (15–16 декабря 2022 г., Санкт-Петербург) [6]. Их достоверность подтверждена в резюмирующем заявлении ВОЗ 5 мая 2023 г. об устойчивой тенденции улучшения эпидемиологической обстановки в мире и снятии с COVID-19 статуса пандемии [7]. Таким образом, наши данные, характеризующиеся мировой научной новизной и практической значимостью, определяют актуальность и необходимость их развернутого представления в печати. **Целью** данной работы является определение продолжительности и возможности прогнозирования пандемии COVID-19 на основе эпидемиологической оценки ее динамики в контексте волнообразного хода, фазового характера, эпидемиологической значимости филогенетических преобразований возбудителя.

Использован глобальный электронный ресурс в сети Интернет под условным названием «Коронавирус. Статистика», основу которого составили данные Медицинского университета Джона Хопкинса. Проанализированы материалы двух интернет-источников [8, 9], представлявшие собой динамику ежедневного учета в мире случаев заражения SARS-CoV-2 людей, летальных исходов. На 10 марта 2023 г. (последняя дата корректировки материалов Медицинским университетом Джона

Хопкинса) зарегистрировано 682041292 случая заражения, из них 6907106 случаев смерти. Данные материалы, представленные в сети Интернет в графическом выражении для использования в режиме реального времени, по закону больших чисел (ЗБЧ в теории вероятностей) объективно характеризуют ход пандемии COVID-19 и не требуют статистической обработки. Вместе с тем использование при оценке динамики пандемии на примере COVID-19 глобального электронного ресурса «Коронавирус. Статистика» в комплексе с примененными в глобальном масштабе филогенетическими технологиями при тестировании возбудителя SARS-CoV-2 представляются для эпидемиологов как впервые появившиеся возможности в плане объективной оценки и эпидемиологической интерпретации динамики пандемии в целом. Пандемия COVID-19, обозначившаяся как экстраординарная по эпидемическим масштабам, социально-экономическим и геополитическим последствиям чрезвычайная ситуация (за последние 100 лет), трудно сдерживаемая санитарно-противоэпидемическими (профилактическими) мероприятиями, предстала как модельный объект для корректной оценки продолжительности, фазового характера и возможности эпидемиологического прогнозирования. Выбранная методология исследования, включающая использование для анализа интернет-ресурсов статистики заболеваемости/летальности в мире и результатов применения филогенетических технологий при тестировании возбудителя SARS-CoV-2, оказалась инновационно эффективным инструментом познания и достижения мировой научной новизны и практической значимости полученных результатов.

Выявленная продолжительность пандемии COVID-19 в основном своем проявлении (эпидемическая фаза) – 2 года – подтвердила существующую в литературе [10] примерную среднюю арифметическую величину продолжительности подобного масштаба эпидемического распространения острых респираторных вирусных инфекционных болезней, составившую 2 года. Эта величина была определена при анализе материалов 45 эпидемий (пандемий) гриппа, 83 эпидемических лет за 500-летний период наблюдения (XV–XX вв.). Практически в 2 года «уложились» в основном своем проявлении такие пандемии гриппа, как A/H1N1/ «испанка» (1918–1919 гг.), A/H2N2/ «азиатский грипп» (1957–1958 гг.), A/H3N2/ «гонконгский грипп» (2-я половина 1968 г. – 1-я половина 1970 г.), A/H1N1/ «русский грипп» (1977–1978 гг.), A/H1N1/09 «свиной грипп» (2009–2010 гг.).

Анализ материалов графического выражения динамики пандемии COVID-19 в мире выявил ее принадлежность к типичному в эпидемиологии, наиболее известному в 20–30-х гг. XX столетия варианту эпидемического распространения инфекционных болезней со свойственными ему волнами, длящимися месяцами, не совпадающими с годовыми солнечными циклами. Волны характеризуются относительно короткой восходящей ветвью, свидетельствующей о продолжительности инкубационного периода болезни, и относительно удлиненной нисходящей ветвью, указывающей на наличие вторичных случаев при заражении от первичных больных [3]. Соответственно, сокращение нисходящей ветви при проведении противоэпидемических мероприятий логично будет указывать на их эффективность. В динамике пандемий (эпидемий) выделяли три фазы: предэпидемическую, эпидемическую и постэпидемическую. Смену фаз предположительно объясняли изменением вирулентности возбудителя, обратно пропорциональным доле иммунных лиц в составе коллектива [3–5]. Снижение вирулентности возбудителя в постэпидемическую фазу связывали с нарастающим иммунологическим прессингом со стороны популяции хозяина. Вирулентность, как известно, является фенотипическим признаком. Поэтому объяснение явления фазности эпидемий на основе изменения вирулентности возбудителя носило предположительный характер. Предположение о детерминированности фазового характера эпидемического процесса генетическими преобразованиями возбудителя, сопровождающимися клинико-эпидемиологическими изменениями болезни, сформировалось в 80-х гг. XX в. в работах В.Д. Белякова и соавт. [4] и Б.Л. Черкасского [5]. В этих работах предположительный характер филогенетических изменений возбудителя (появление маркеров с филогенетическими, временными, географическими значениями) объясняется невозможностью их выявления в то время с помощью рутинных фенотипических методов.

В настоящее время в динамике пандемии COVID-19 установлен фазовый характер эпидемического процесса и его детерминированность геномными изменениями возбудителя путем регистрации последовательной смены глобального доминирования в начале пандемии филогенетического варианта уханьский, на подъеме и высоте (эпидемическая фаза) – штамма дельта и на спаде пандемии (пост-эпидемическая фаза) – варианта омикрон, что является надежным доказательством фазового характера эпидемического процесса и пандемии в целом. Эти данные имеют первостепенное значение при определении продолжительности пандемии COVID-19 и построении эпидемиологического прогноза.

Переходя к конкретной эпидемиологической интерпретации данных глобального информационного ресурса «Коронавирус: статистика в мире» [8] (срок функционирования данного интернет-источника – до середины ноября 2022 г.), представленных на рис. 1, сразу же необходимо отметить, что графическое выражение динамики пандемии COVID-19 в мире (динамика количества зараженного населения – верхний ряд) идентифицируется как типичный в эпидемиологии и наиболее широко распространенный в 20–30-х гг. XX в. вариант эпидемического распространения инфекционной болезни со свойственными ему волнами, длящимися месяцами, не совпадающими с годовыми солнечными циклами [3].

Данные нижнего ряда на рис. 1 отчетливо характеризуют нарастание числа летальных случаев в начале пандемии (март – май 2020 г.), на подъеме (июнь – октябрь 2020 г.), высоте (ноябрь 2020 – февраль 2022 г.), резкий спад до минимального уровня в мае – октябре 2022 г.

Что касается верхнего ряда, то в первую очередь обращает на себя внимание самая высокая волна числа зараженных SARS-CoV-2, зарегистрированная в январе – марте 2022 г., превысившая примерно в 5 раз по амплитуде и в 2 раза по фазе предшествовавшие волны. Крутая (короткая) восходящая ветвь этой волны, как известно в эпидемиологии, свидетельствует

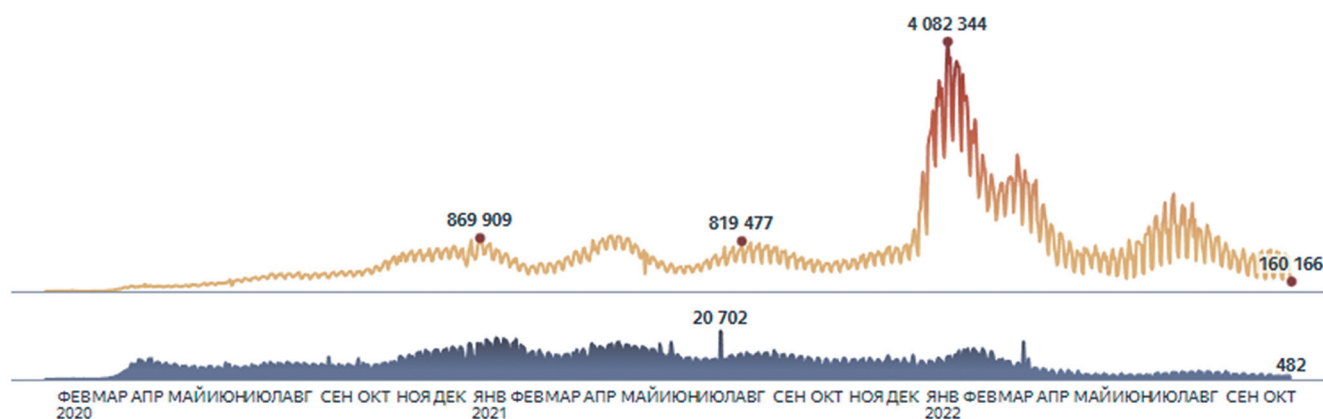


Рис. 1. Динамика количества ежедневных случаев заражения населения (верхний ряд) и летальных исходов (нижний ряд) COVID-19 в мире в 2020–2022 (октябрь) гг. [8]

Fig. 1. Dynamics of the number of daily cases of infection (top row) and lethal outcomes (bottom row) of COVID-19 in the world in 2020–2022 (October) [8]

об относительно коротком инкубационном периоде болезни, удлиненная нисходящая ветвь с небольшим подъемом на пути снижения указывает на наличие вторичных случаев при заражении от первичных больных [3]. Самая высокая волна зараженности населения на рис. 1 обозначилась непропорционально низкой амплитудой роста абсолютного ежедневного числа летальных случаев по отношению к эксплозивному увеличению числа зараженных. И эта тенденция разрыва в амплитуде количества зараженных и летальных случаев устойчиво закрепилась на волне в июне – августе 2022 г. Все вышеуказанные признаки, свидетельствовавшие о наступлении в мире периода более легкого клинического течения и большей активности передачи COVID-19, были связаны с филогенетическим вариантом SARS-CoV-2 омикрон, впервые идентифицированным в Ботсване и ЮАР в ноябре 2021 г. и получившим вначале стремительное распространение на юге Африки [2].

Как известно, клинко-эпидемиологическими особенностями глобального доминирования филогенетического варианта омикрон стали относительно короткий инкубационный период и сравнительно легкое клиническое течение болезни с преимущественной локализацией патологического процесса в верхних дыхательных путях, с которыми связаны и большая активность воздушно-капельного пути передачи инфекции, и высокая коммуникационная (контактная) активность инфицированных («легче болеющих» и носителей) людей как источников инфекции. На период наступления глобального доминирования штамма омикрон приходится основная разгрузка госпитальной сети, смещение акцента и последующее снижение нагрузки на амбулаторно-поликлиническое звено здравоохранения. По существу, речь идет о клинко-эпидемиологическом и филогенетическом подтверждении наступления фазы спада пандемии – постэпидемической фазы COVID-19, а штамм омикрон, в соответствии с указанным клинко-эпидемиологическим сопровождением и позицией В.Д. Белякова и соавт. [4] относи-

тельно фазового характера эпидемического процесса, является резервационным вариантом.

Всего по данным рис. 1 за период пандемии COVID-19 (март 2020 – октябрь 2022 г.) в мире зарегистрировано 5 волн числа зараженных и 5 волн числа летальных случаев. Вместе с тем, как можно видеть на рис. 1, первая волна количества летальных случаев (март – май 2020 г.) не сопровождалась заметной волной числа зараженных. Этот феномен можно объяснить человеческим фактором. Суть этого фактора, как представляется, состоит в непреднамеренном значительном занижении в начале пандемии количества зараженных SARS-CoV-2 лиц (соответственно, завышении числа смертей) в связи с акцентированием внимания при эпидемиологических расследованиях прежде всего на тяжелых и летальных случаях, особенно в странах с ограниченными диагностическими и кадровыми возможностями в начале пандемии. По существу, из поля зрения выпали легкие и бессимптомные случаи. Последние, например, составили 74 % в феврале 2020 г. на круизном лайнере Diamond Princess, где из 3711 пассажиров и членов экипажа инфекция COVID-19 была установлена у 712 лиц [11].

Естественно, что версия о наличии 1-й волны, а в целом 6 волн зараженности SARS-CoV-2 в мире (по октябрь 2022 г.), может быть поддержана фактическими данными, полученными, например, в стране, где с самого начала пандемии выявление всего спектра зараженных SARS-CoV-2 случаев было поставлено на поток. О том, что указанная выше волна числа инфицированных имела место, свидетельствуют данные из информационного ресурса «Коронавирус: статистика в мире» [8], полученные на территории Российской Федерации и приведенные на рис. 2.

Как можно видеть на рис. 2, в России в 2020–2022 (октябрь) гг. зарегистрировано 6 волн числа зараженных (верхний ряд), из которых 1-я волна (апрель – июль 2020 г.) на региональном уровне указывает на реальность 1-й волны в мире (рис. 1, верхний ряд), которая должна была проявиться на фоне

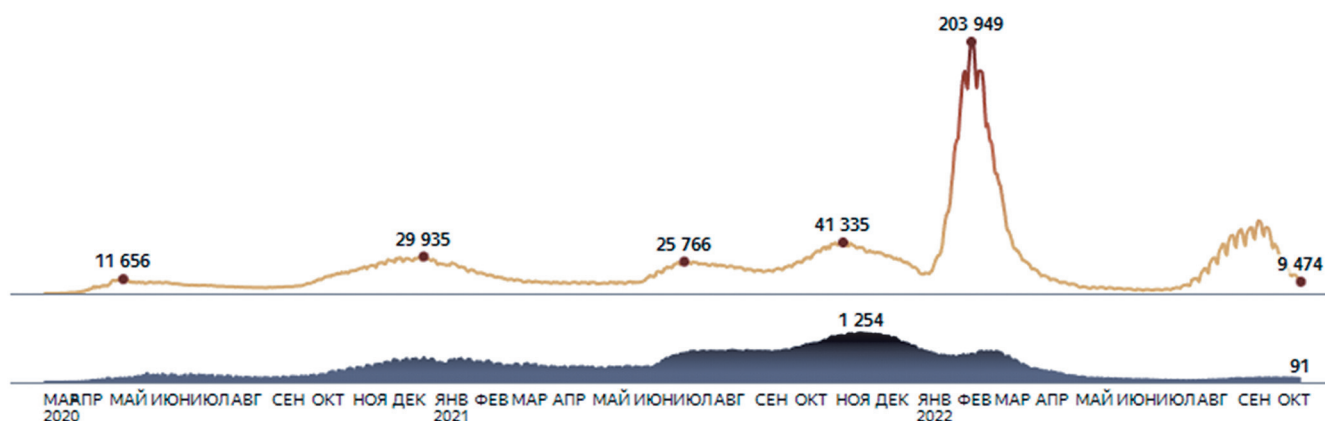


Рис. 2. Динамика количества новых случаев заражения населения (верхний ряд) и летальных исходов (нижний ряд) COVID-19 в России по дням в ходе пандемии в 2020–2022 (октябрь) гг. [8]

Fig. 2. Dynamics of the number of new cases of infection (top row) and deaths (bottom row) of COVID-19 in Russia by day during the pandemic in 2020–2022 (October) [8]

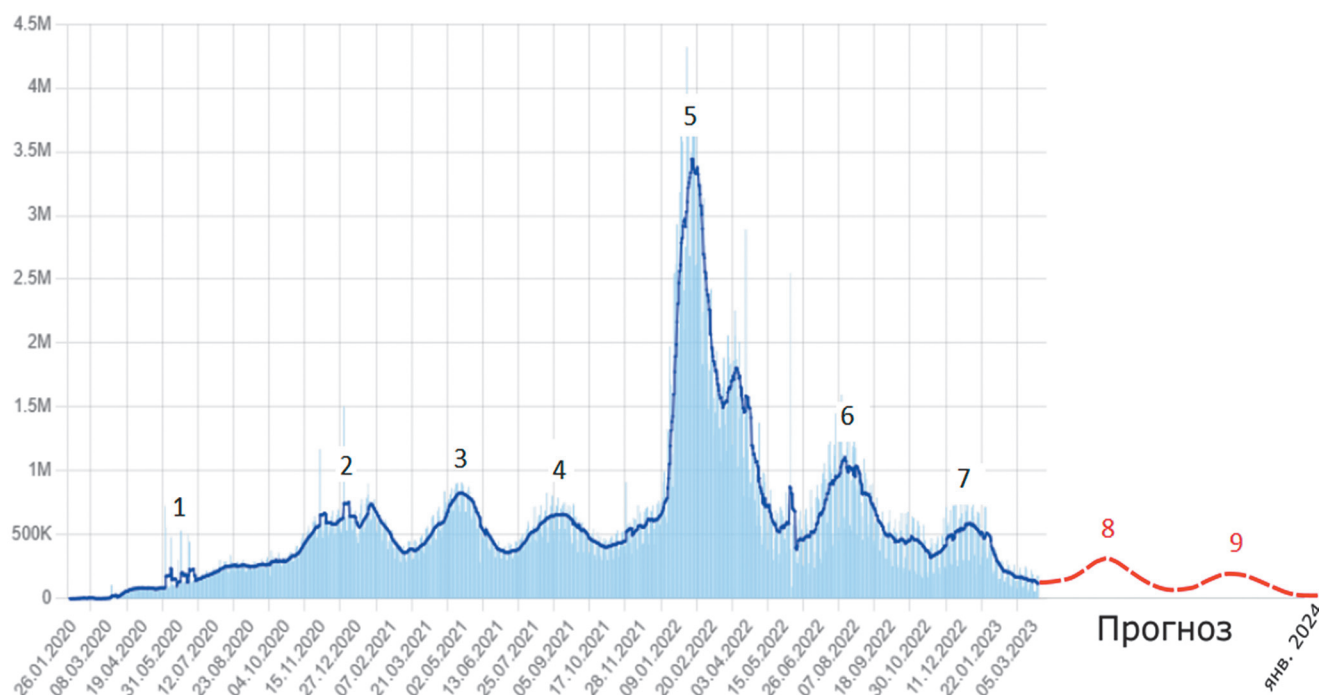


Рис. 3. Динамика количества ежедневных случаев заражения SARS-CoV-2 по состоявшимся (1–7-я) волнам в мире и прогнозируемым (8–9-я) волнам на 2023 – начало 2024 г.

Fig. 3. Dynamics of the number of daily cases of SARS-CoV-2 infection by completed (1st–7th) waves in the world and predicted (8th–9th) waves for 2023 – early 2024

волны числа летальных случаев в начале пандемии. Короткая нисходящая ветвь 5-й волны свидетельствует об эффективности противоэпидемических мероприятий [12]. В целом в мире с учетом данных рис. 2 можно насчитать 6 волн числа зараженных и 5 волн числа летальных случаев, т.е. на одну волну летальных случаев меньше, чем зараженных, в связи с наступлением периода более легкого клинического течения COVID-19, снижения уровня летальных исходов, т.е. постэпидемической фазы. При известной продолжительности эпидемической фазы пандемии COVID-19 – 2 года (март 2020 – март 2022 г.) – продолжительность и характер постэпидемической фазы являются предметом эпидемиологического прогноза. Наиболее корректной постановка эпидемиологи-

ческого прогноза представляется с учетом данных глобального электронного информационного ресурса «Статистика коронавируса в мире» [9], последний раз обновленных Медицинским университетом Джона Хопкинса 10 марта 2023 г. Указанные данные на начало марта 2023 г. приведены на рис. 3.

Как можно видеть на рис. 3, представлены данные о 7 состоявшихся волнах числа зараженного SARS-CoV-2 населения, в том числе и первой волне, о которой не было сведений на рис. 1, но были данные на рис. 2. Прерывистой линией на рис. 3 помечены две прогнозируемые (8-я и 9-я) с уменьшающейся амплитудой волны. Конкретные данные о состоявшихся волнах с учетом их нумерации на рис. 3 приведены в таблице.

Информация о состоявшихся волнах COVID-19 в мире

Data on the completed waves of COVID-19 in the world

Волна, № п/п Wave No.	Продолжительность волны, мес. Duration of the wave, months	Дата регистрации пиковых значений Date of peak value registration	Пиковое число зараженных Peak number of the infected		
			абс. abs.	из них летальных исходов out of them with lethal outcome	
				абс. abs.	%
1	4	14.08.2020	307205	6581	2,1
2	5	07.01.2021	869909	14965	1,7
3	4	23.04.2021	907683	15260	1,7
4	4	15.07.2021	819476	20702	2,5
5	7	19.01.2022	4082344	9931	0,2
6	5	19.07.2022	1524204	3106	0,2
7	4	08.12.2022	808903	2997	0,4

Из 7 волн пандемии COVID-19, зарегистрированных в мире на начало марта 2023 г., 1–4-я волны принадлежали к эпидемической фазе, 6–7-я волны – постэпидемической фазе. Волны варьировали по продолжительности от 4 до 7 мес. (М – 4,6 мес.) и по амплитуде от 307205 до 4082344 (М – 1331389,1) пиковых значений числа зараженных людей и соответственно числа летальных исходов – от 2997 до 20702 (М – 10506). Пиковое число летальных исходов варьировало от 2,5 до 0,2 %. Самая высокая амплитуда волны числа зараженных (пиковое число – 4082344) и самый высокий разрыв в амплитуде числа зараженных и летальных исходов (пиковое число – 9931) приходится на 5-ю волну (дата регистрации пиковых значений – 19.01.2022), обусловленную наступлением периода глобального доминирования филогенетического варианта SARS-CoV-2 омикрон, т.е. постэпидемической фазы. Продолжительность этой фазы составила 1 год – с марта 2022 по март 2023 г. Этот период характеризовался устойчивой тенденцией количественного уменьшения SARS-CoV-2 омикрон в виде ундулирующей динамики с неуклонно снижающейся амплитудой волн числа зараженных на фоне резкого снижения числа летальных исходов по сравнению с эпидемической фазой. В последующие после марта месяцы 2023 г. прогнозируется продолжение постэпидемической фазы в виде еще двух волн, общей продолжительностью около 10 мес. Вместе с тем при рассмотрении пандемии COVID-19 в целом как единой волны, восходящая ветвь которой составляет 2 года (продолжительность эпидемической фазы), а нисходящая ветвь должна ее превышать (более 2 лет, при том что в марте 2023 г. она составила всего 1 год), завершения постэпидемической фазы следует ожидать в первом полугодии 2024 г.

После представления статьи в редакцию для опубликования в новом интернет-источнике [13] появились данные, констатирующие реальность возникновения волны, прогнозируемой нами выше 8-й в ходе спада пандемии COVID-19. Новая волна проявилась в июле, августе и сентябре 2023 г. с пиковым значением числа новых случаев заражения в мире 31 августа – 87251 человек, что составляет примерно 8-кратное уменьшение амплитуды 8-й волны по отношению к предшествовавшей 7-й волне (пиковое значение числа зараженных – 808903 человека), свидетельствующее о глубоком спаде пандемии. Согласно данному интернет-источнику [13], общее количество зараженного населения в мире на 10 октября 2023 г. составило 696387988 человек, из них с летальным исходом – 6924812 (1 %).

Поскольку эпидемиологический прогноз касается продолжительности постэпидемической фазы пандемии COVID-19, констатация которой (фазы) уже имеет прогностическое значение, необходимо еще раз обратить внимание на всю совокупность научных данных, на которых в целом основывается оценка характера этой пандемии и строится эпиде-

миологический прогноз. Эти данные отражены в следующих положениях:

1) впервые в истории эпидемиологии в ходе изучения динамики реальной пандемии на примере COVID-19 создана глобальная методология, включающая комплексное применение филогенетических технологий при тестировании возбудителя SARS-CoV-2 и электронного информационного ресурса в сети Интернет «Коронавирус. Статистика» в режиме реального времени, насчитывающего более 680 млн зараженных человек и более 6,9 млн летальных исходов; на 10 октября 2023 г. число инфицированных составило 696387988, из них с летальным исходом – 6924812 (1 %) [13];

2) установлена аналогия графического выражения зараженности населения SARS-CoV-2 в мире в ходе пандемии COVID-19 и широко известного в 20–30-х гг. XX столетия варианта эпидемического распространения инфекционной болезни со свойственными ему волнами, длящимися месяцами, не совпадающими с годовыми солнечными циклами и характеризующимися относительно короткой восходящей ветвью, свидетельствующей о продолжительности инкубационного периода болезни, и относительно удлиненной нисходящей ветвью, указывающей на образование вторичных случаев при заражении от первичных больных;

3) учтено известное в эпидемиологии дифференцирование хода пандемий (эпидемий) на три фазы: предэпидемическую, эпидемическую, постэпидемическую – и соответствующее объяснение смены этих фаз изменением вирулентности возбудителя, обратно пропорциональным нарастанию доли иммунных лиц в составе коллектива;

4) впервые выявлена филогенетическая изменчивость возбудителя в ходе реальной пандемии, сопряженная с ее пространственно-временной динамикой, переходом к доминированию резервационного варианта возбудителя омикрон и наступлением постэпидемической фазы, носившим характер скачка;

5) впервые показана обусловленность фазового характера пандемии COVID-19 последовательной сменой в течение двух лет (март 2020 – март 2022 г.) трех филогенетических вариантов SARS-CoV-2: начавшего пандемию эпидемического уханьского штамма глобальным доминированием на ее подъеме и высоте эпидемического варианта дельта и на спаде пандемии – резервационного варианта омикрон;

6) впервые в ходе пандемии установлено сопровождение смены глобального доминирования филогенетических вариантов возбудителя клинико-эпидемиологическими изменениями болезни;

7) охарактеризовано клинико-эпидемиологическое сопровождение акта глобального доминирования резервационного варианта SARS-CoV-2 омикрон в постэпидемическую фазу по таким признакам, как: а) сокращение инкубационного периода; б) более легкое клиническое течение болезни; в) преимущественная локализация патологического процесса в

верхних дыхательных путях; г) высокая активность воздушно-капельного пути передачи, д) высокая коммуникационная (контактная) активность источников инфекции; е) разгрузка госпитальной сети, смещение акцента и снижение нагрузки на амбулаторно-поликлиническое звено здравоохранения;

8) установлена продолжительность эпидемической фазы – примерно 2 года (март 2020 – март 2022 г.), что соответствовало примерной средней арифметической величине (2 года) продолжительности одной эпидемии (пандемии) гриппа, определенной на основе материалов 45 эпидемий (пандемий) гриппа, 83 эпидемических лет за 500-летний период наблюдения (XV–XX вв.). Эти данные сближают COVID-19 с другими острыми респираторными вирусными инфекционными болезнями зоонозной природы, что может быть использовано в разработке единой модели острой респираторной вирусной инфекционной болезни как объекта эпидемиологического надзора и тестовой составляющей содержания противоэпидемической готовности к будущим пандемиям – чрезвычайным ситуациям в области общественного здравоохранения, имеющим международное значение [Международные медико-санитарные правила (2005 г.)] [14];

9) установлено наступление постэпидемической фазы COVID-19 в период с марта 2022 – по март 2023 г. (1 год), проявившееся в устойчивой тенденции количественного уменьшения SARS-CoV-2 омикрон в виде ундулирующей динамики с неуклонно снижающейся амплитудой волн зараженности населения на фоне установившегося низкого уровня летальности по сравнению с эпидемической фазой.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Virtual press conference on COVID-19. 11 March 2020 [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/docs/default-sources/coronaviruse/transcripts/who-audio-emergencies-coronavirus-press-conference-full-and-final-11mar2020.pdf?sfvrsn=cb432bb3_2 (дата обращения 01.04.2020).
2. Viana R., Moyo S., Amoako D.G., Tegally H., Scheepers C., Althaus C.L., Anyaneji U.J., Bester P.A., Boni M.F., Chand M., Choga W.T., Colquhoun R., Davids M., Deforche K., Doolabh D., du Plessis L., Engelbrecht S., Everatt J., Giandhari J., Giovanetti M., Hardie D., Hill V., Hsiao N.Y., Iranzadeh A., Ismail A., Joseph C., Joseph R., Koopile L., Kosakovsky Pond S.L., Kraemer M.U.G., Kuate-Lere L., Laguda-Akingba O., Lesetedi-Mafoko O., Lessells R.J., Lockman S., Lucaci A.G., Maharaj A., Mahlangu B., Maponga T., Mahlakwane K., Makatini Z., Marais G., Maruapula D., Masupu K., Matshaba M., Mayaphi S., Mbhele N., Mbulawa M.B., Mendes A., Mlisana K., Mnguni A., Mohale T., Moir M., Moruise K., Mosepele M., Motsatsi G., Motswaledi M.S., Mphoyakgosi T., Msomi N., Mwangi P.N., Naidoo Y., Ntuli N., Nyaga M., Olubayo L., Pillay S., Radibe B., Ramphal Y., Ramphal U., San J.E., Scott L., Shapiro R., Singh L., Smith-Lawrence P., Stevens W., Strydom A., Subramoney K., Tebeila N., Tshiabula D., Tsui J., van Wyk S., Weaver S., Wibmer C.K., Wilkinson E., Wolter N., Zarebski A.E., Zuze B., Goedhals D., Preiser W., Treurnicht F., Venter M., Williamson C., Pybus O.G., Bhiman J., Glass A., Martin D.P., Rambaut A., Gaseitsiwe S., von Gottberg A., de Oliveira T. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature*. 2022; 603(7902):679–86. DOI: 10.1038/s41586-022-04411-y.

3. Сталлибрасс К. Основы эпидемиологии. М.; Л.: Биомедгиз; 1936. 591 с.
4. Беляков В.Д., Каминский Г.Д. Управляемые инфекции и саморегуляция паразитарных систем. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1986; 11:8–12.
5. Черкасский Б.Л. Эпидемический процесс как система. Сообщение 1. Структура эпидемического процесса. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1985; 3:45–51.
6. Топорков В.П. Пандемия COVID-19: продолжительность и определяющие ее факторы. В кн.: Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Сборник материалов III Международной научно-практической конференции по вопросам противодействия новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям (15–16 декабря 2022 г., Санкт-Петербург). Саратов: Амирит; 2022. С. 214–5.
7. ВОЗ объявила об окончании пандемии COVID-19. [Электронный ресурс]. URL: <https://rg.ru/2023/05/09/virus-ne-ushe.html> (дата обращения 05.05.2023).
8. Коронавирус: статистика в мире. [Электронный ресурс]. URL: <https://yandex.ru/covid19/stat?geoid=225&ysclid=i811gbxa5w326113632> (дата обращения 08.11.2022).
9. Статистика коронавируса в мире. [Электронный ресурс]. URL: <https://gogov.ru/COVID-19/world> (дата обращения 10.03.2023).
10. Чижевский А.Л. Земное эхо солнечных бурь. М.: Мысль; 1976. 367 с.
11. Emery J.C., Russell T.W., Liu Y., Hellewell J., Pearson C.A.; CMMID COVID-19 Working Group; Knight G.M., Eggo R.M., Kucharski A.J., Funk S., Flasche S., Houben R.M. The contribution of asymptomatic SARS-CoV-2 infections to transmission on the Diamond Princess cruise ship. *Elife*. 2020; 9:e58699. DOI: 10.7554/eLife.58699.
12. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Сафронов В.А., Карнаухов И.Г., Иванова А.В., Щербакова С.А. Эпидемиологические особенности новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Сообщение 1: Модели реализации профилактических и противоэпидемических мероприятий. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:6–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-6-13.
13. COVID – Coronavirus Statistics – Worldometer. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.worldometers.info/coronavirus/> (дата обращения 10.10.2023).
14. Международные медико-санитарные правила (2005 г.). 3-е изд. ВОЗ, Женева; 2016. 82 с.

References

1. VirtualpressconferenceonCOVID-19. 11 March 2020. (Cited 01 Apr 2020). [Internet]. Available from: https://www.who.int/docs/default-sources/coronaviruse/transcripts/who-audio-emergencies-coronavirus-press-conference-full-and-final-11mar2020.pdf?sfvrsn=cb432bb3_2.
2. Viana R., Moyo S., Amoako D.G., Tegally H., Scheepers C., Althaus C.L., Anyaneji U.J., Bester P.A., Boni M.F., Chand M., Choga W.T., Colquhoun R., Davids M., Deforche K., Doolabh D., du Plessis L., Engelbrecht S., Everatt J., Giandhari J., Giovanetti M., Hardie D., Hill V., Hsiao N.Y., Iranzadeh A., Ismail A., Joseph C., Joseph R., Koopile L., Kosakovsky Pond S.L., Kraemer M.U.G., Kuate-Lere L., Laguda-Akingba O., Lesetedi-Mafoko O., Lessells R.J., Lockman S., Lucaci A.G., Maharaj A., Mahlangu B., Maponga T., Mahlakwane K., Makatini Z., Marais G., Maruapula D., Masupu K., Matshaba M., Mayaphi S., Mbhele N., Mbulawa M.B., Mendes A., Mlisana K., Mnguni A., Mohale T., Moir M., Moruise K., Mosepele M., Motsatsi G., Motswaledi M.S., Mphoyakgosi T., Msomi N., Mwangi P.N., Naidoo Y., Ntuli N., Nyaga M., Olubayo L., Pillay S., Radibe B., Ramphal Y., Ramphal U., San J.E., Scott L., Shapiro R., Singh L., Smith-Lawrence P., Stevens W., Strydom A., Subramoney K., Tebeila N., Tshiabula D., Tsui J., van Wyk S., Weaver S., Wibmer C.K., Wilkinson E., Wolter N., Zarebski A.E., Zuze B., Goedhals D., Preiser W., Treurnicht F., Venter M., Williamson C., Pybus O.G., Bhiman J., Glass A., Martin D.P., Rambaut A., Gaseitsiwe S., von Gottberg A., de Oliveira T. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature*. 2022; 603(7902):679–86. DOI: 10.1038/s41586-022-04411-y.
3. Stallibrass K. [Fundamentals of Epidemiology]. Moscow; Leningrad: “Biomedgiz”; 1936. 591 p.
4. Belyakov V.D., Kaminsky G.D. [Controlled infections and self-regulation of parasitic systems]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 1986; (11):8–12.
5. Cherkassky B.L. [Epidemic process as a system. Communication 1. Structure of the epidemic process]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 1985; (3):45–51.
6. Toporkov V.P. [COVID-19 pandemic: duration and factors determining it]. In: Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Proceedings of the III International Scientific and Practical Conference on com-

bating the new coronavirus infection and other infectious diseases (December 15–16, 2022, St. Petersburg)]. Saratov: “Amirit”; 2022. P. 214–5.

7. [WHO has declared the end of the COVID-19 pandemic]. (Cited 05 May 2023). [Internet]. Available from: <https://rg.ru/2023/05/09/virus-ne-ushel.html>.

8. [Coronavirus: statistics in the world]. (Cited 08 Nov 2022). [Internet]. Available from: <https://yandex.ru/covid19/stat?geoId=225&ysclid=1811gbxa5w326113632>.

9. [Coronavirus statistics in the world]. (Cited 10 Mar 2023). [Internet]. Available from: <https://gogov.ru/covid-19/world>.

10. Chizhevsky A.L. [Earthly Echo of Solar Storms]. Moscow: “Mysl”; 1976. 367 p.

11. Emery J.C., Russell T.W., Liu Y., Hellewell J., Pearson C.A.; CMMID COVID-19 Working Group; Knight G.M., Eggo R.M., Kucharski A.J., Funk S., Flasche S., Houben R.M. The contribution of asymptomatic SARS-CoV-2 infections to transmission on the Diamond Princess cruise ship. *Elife*. 2020; 9:e58699. DOI: 10.7554/eLife.58699.

12. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Smolensky V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Safronov V.A., Karnaukhov I.G., Ivanova A.V.,

Shcherbakova S.A. [Epidemiological features of new coronavirus infection (COVID-19). Communication 1: Modes of implementation of preventive and anti-epidemic measures]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):6–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-I-6-13.

13. COVID – Coronavirus Statistics – Worldometer. (Cited 10 Oct 2023). [Internet]. Available from: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>.

14. International Health regulations (2005). 3rd edition. WHO, Geneva; 2016. 82 p.

Authors:

Toporkov V.P. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

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

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-149-155

УДК 616.98:579.842.23

Д.А. Шаров, И.В. Дармов, И.В. Косенков, А.А. Лещенко, С.В. Багин, Д.А. Мохов,
А.Г. Лазыкин, Е.А. Коваленко**Оценка возможности использования одноразовых полимерных контейнеров
в технологии производства вакцины чумной живой**Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров),
Киров, Российская Федерация

Цель работы – оценка возможности использования одноразовых полимерных контейнеров в технологии производства вакцины чумной живой. **Материалы и методы.** Использовали вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. Для глубинного выращивания посевной культуры чумного микроба применяли стандартный одноразовый полимерный контейнер типа Flexboy объемом 10 л фирмы Sartorius Stedim Biotech, оборудованный фильтр-капсулами Sartopore 2. Сравнение проводили с регламентной технологией получения посевных культур с использованием стеклянных бутылей объемом 20 л. Контроль полученных посевных культур вакцинного штамма EV осуществляли в соответствии с ФС.3.3.1.0022.15. Выращивание посевной культуры в одноразовом полимерном контейнере проводили в жидкой питательной среде при температуре от 26 до 28 °С с непрерывным барботажем и механическим перемешиванием с частотой от 80 до 90 колебаний в минуту. Для аэрации использовался сжатый воздух с давлением от 0,3 до 0,4 кгс/см². Объемный расход стерильного воздуха, подаваемого на аэрацию, составлял от 0,9 до 1,0 л/мин. **Результаты и обсуждение.** Применение одноразовых полимерных контейнеров позволило сократить продолжительность технологической стадии получения посевной культуры в 1,7 раза и увеличить выход живых микробов с единицы объема питательной среды, по сравнению с регламентной, в 2,8 раза. Таким образом, показана возможность и перспективность использования одноразовых полимерных контейнеров в технологии производства вакцины чумной живой на стадии приготовления посевных культур.

Ключевые слова: одноразовый полимерный контейнер, вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV, производство вакцины чумной живой, стадия получения посевных культур.

Корреспондирующий автор: Лещенко Андрей Анатольевич, e-mail: 23527@mail.ru.

Для цитирования: Шаров Д.А., Дармов И.В., Косенков И.В., Лещенко А.А., Багин С.В., Мохов Д.А., Лазыкин А.Г., Коваленко Е.А. Оценка возможности использования одноразовых полимерных контейнеров в технологии производства вакцины чумной живой. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:149–155. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-149-155

Поступила 26.06.2023. Отправлена на доработку 04.07.2023. Принята к публ. 26.07.2023.

D.A. Sharov, I.V. Darmov, I.V. Kosenkov, A.A. Leshchenko, S.V. Bagin, D.A. Mokhov, A.G. Lazykin,
E.A. Kovalenko**Possibility of Using Disposable Polymeric Containers in the Production Technology
of Live Plague Vaccine**Affiliated Branch of the “48th Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov,
Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to assess the possibility of using disposable polymeric containers in the production technology of the live plague vaccine. **Materials and methods.** We deployed the vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIEG for the work. A standard disposable 10 L Flexboy type polymeric container manufactured by Sartorius Stedim Biotech, equipped with Sartopore 2 filter capsules, was used for submerged cultivation of plague microbe inoculum. This method was compared to the regulated technology for obtaining seed cultures using glass bottles with a volume of 20 liters. The control of the produced seed cultures of the vaccine strain EV was performed in accordance with FS.3.3.1.0022.15. The cultivation of the seed culture in a disposable polymeric container was carried out in a liquid nutrient medium at a temperature of 26 to 28 °C with continuous barbotage and mechanical agitation with a platform oscillation frequency of 80 to 90 per minute. For aeration, compressed air with a pressure of 0.3 to 0.4 kgf/cm² was used. The volumetric flow rate of sterile air supplied for aeration ranged from 0.9 to 1.0 l/min. **Results and discussion.** The use of disposable polymeric containers made it possible to reduce the duration of the technological stage of obtaining a seed culture by 1.7 times and increase the yield of live microbes per unit volume of the nutrient medium by 2.8 times, as compared to the regulated production technology. Thus, the possibility and prospects of using disposable polymeric containers in the production technology of live plague vaccine at the stage of preparation of sowing cultures is evidenced.

Key words: disposable polymeric container, *Yersinia pestis* EV vaccine strain, live plague vaccine production, stage of obtaining sowing cultures.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Andrey A. Leshchenko, e-mail: 23527@mail.ru.

Citation: Sharov D.A., Darmov I.V., Kosenkov I.V., Leshchenko A.A., Bagin S.V., Mokhov D.A., Lazykin A.G., Kovalenko E.A. Possibility of Using Disposable Polymeric Containers in the Production Technology of Live Plague Vaccine. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2023; 4:149–155. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-149-155

Received 26.06.2023. Revised 04.07.2023. Accepted 26.07.2023.

Приоритетной задачей, согласно Указу Президента РФ от 2 июля 2021 г. № 400 «О Стратегии национальной безопасности Российской Федерации», является расширение производства лекарственных средств, медицинских изделий, отечественных вакцин против актуальных инфекционных болезней. Решение данной задачи требует своевременного совершенствования технологий, внедрения в них современного инновационного оборудования и материалов.

Одним из жизненно необходимых и важных лекарственных препаратов для медицинского применения является «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, ингаляций и кожного скарификационного нанесения» (Распоряжение Правительства РФ от 12 октября 2019 г. № 2406-р).

В соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации (XIV изд. Т. IV. М., 2018. С. 5342–5350), производство вакцины предусматривает технологические стадии: получения посевных культур I, II и III генераций; накопления биомассы, выращенной для приготовления вакцинной взвеси с необходимой концентрацией; розлива, замораживания, сублимационного высушивания, герметизации и упаковки препарата. Опыт выпуска вакцины чумной живой и развитие рынка биотехнологического оборудования способствовали совершенствованию основных стадий ее производства путем внедрения новых решений, направленных на повышение качества готового препарата и эффективности технологии в целом [1–4].

Процесс приготовления посевных культур является одной из основных стадий в технологии производства вакцины чумной живой, реализация которой определяет качество полуфабрикатов и готовой формы препарата. Получение посевной культуры в рамках существующей технологии осуществляется способом глубинного выращивания вакцинного штамма в жидкой питательной среде (ПС). Культивирование проводится в течение 48 ч в стеклянных бутылках вместимостью 20 л, оборудованных специальными монтажами, при постоянной аэрации согласно ПР 08461522-23-14 «Промышленный регламент на производство вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, ингаляций и кожного скарификационного нанесения». Практическим недостатком использования данных решений является продолжительность подготовительных работ (до 24 ч), сопровождающихся многооперационностью и энергозатратностью. Кроме того, достаточно высоки риски получения брака продукта по причине контаминации или попадания в ПС веществ, ингибирующих рост микробов.

В современных условиях при организации асептических производств микробиологических препаратов все чаще находит применение одноразовое емкостное оборудование из инертных полимерных материалов. Простота конструкции данного оборудо-

вания, изначальная гарантированная стерильность, возможность «гибкого» встраивания в технологический процесс обеспечивают сокращение подготовительных работ и повышают защищенность продукта на этапах его производства и хранения [5–8]. В связи с этим внедрение одноразовых полимерных контейнеров в технологию производства чумной вакцины на стадии получения посевной культуры является актуальной задачей.

Цель работы – оценка возможности использования одноразовых полимерных контейнеров в технологии производства вакцины чумной живой.

Материалы и методы

В экспериментальных исследованиях использовали вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, полученный из Государственной коллекции возбудителей бактериальных инфекций, используемых для разработки и оценки эффективности медицинских средств биологической защиты, филиала ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров).

Глубинное выращивание посевной культуры чумного микроба штамма EV осуществляли двумя способами: в соответствии с требованиями существующего регламента и с применением одноразового полимерного контейнера. Использовали жидкую ПС, приготовленную из ферментативного гидролизата мяса. Для засева использовали стабилизированную в защитной среде рабочую культуру с посевной дозой не менее 0,4 млрд м.к. на 1 мл ПС. Общую концентрацию микробов определяли по отраслевому стандартному образцу мутности бактериальных взвесей на 10 международных единиц (МЕ), что эквивалентно $0,95 \cdot 10^9$ м.к./мл чумного микроба.

При реализации регламентного способа получения посевной культуры чумного микроба штамма EV культивирование проводили в стеклянных бутылках вместимостью 20 л, содержащих 10 л жидкой ПС, в течение 48 ч при температуре от 26 до 28 °C и аэрации не менее 10 л/мин (промышленный регламент ПР 08461522-23-14).

В экспериментальных исследованиях использовался стандартный одноразовый полимерный контейнер типа Flexboy объемом 10 л с коэффициентом заполнения жидкой ПС 0,5 [9]. Перемешивание осуществляли с применением орбитального термостатируемого шейкера ЛАБ-ПУ-01.

Оценку показателей качества посевной культуры проводили в соответствии с ФС.3.3.1.0022.15 «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, ингаляций и кожного скарификационного нанесения».

Материальный баланс получения посевной культуры составлялся согласно требованиям ОСТ 64-02-003-2002 «Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства.

Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения». Расчет выполняли на основании методики, представленной в практикуме по технологии лекарственных форм [10].

Все этапы исследований выполнялись в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Утилизацию одноразовых полимерных контейнеров после использования проводили, руководствуясь СанПиН 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

Статистический анализ полученных результатов выполняли с помощью программы Microsoft Excel. Достоверность результатов оценивали с использованием критерия Стьюдента при уровне доверительной вероятности 0,95 [11]. Кривые линии роста культуры строили с величиной достоверности аппроксимации $R^2 \geq 0,95$.

Результаты и обсуждение

Для реализации экспериментальной технологии получения посевной культуры чумного микроба штамма EV оборудовали лабораторный технологический участок. На платформу орбитального термостатируемого шейкера ЛАБ-ПУ-01 вертикально устанавливали одноразовый полимерный контейнер, фиксировали пластинами, порты ориентировали перпендикулярно блоку управления. В качестве соединительных коммуникаций применяли термопластичные шланги, оборудованные пластмассовыми зажимами для перекрытия воздушных и материальных потоков. Всего смонтировали три порта: первый ($3/8" \times 5/8" \times 50$ см), для выхода воздуха из внутренней полости одноразового полимерного контейнера, фиксировали вертикально и оборудовали фильтр-капсулой Sartopore 2; второй ($1/8" \times 1/4" \times 50$ см) использовали для подачи воздуха под зеркало жидкости; третий ($3/8" \times 5/8" \times 50$ см) – резервный.

Воздух в одноразовый полимерный контейнер подавали под давлением, достаточным для создания скоростного напора, а также преодоления сопротивления трения и гидродинамического сопротивления столба перемешиваемой посевной культуры [12].

Оптимальный гидродинамический режим определяли по результатам изучения динамики накопления в культуре бактерий чумного микроба штамма EV. Оценивали зависимость общей концентрации микробных клеток от времени культивирования посевной культуры. Параллельно осуществляли выращивание посевной культуры в бутылках объемом 20 л (контроль).

С целью приближения к регламентным условиям экспериментальный процесс выращивания посевной культуры в одноразовом полимерном контейнере проводился в соответствии с разработанной технологической схемой, приведенной на рис. 1.

Питательную среду после холодной стерилизации с помощью фильтр-капсулы Sartopore 2 асептически вносили во внутреннюю полость одноразового полимерного контейнера в объеме 5 л, засеивали, помещали заполненный контейнер на термостатируемую платформу орбитального шейкера ЛАБ-ПУ-01 и подключали к аэрации. Культивирование осуществлялось при температуре от 26 до 28 °С, с непрерывным барботажем и механическим перемешиванием с частотой от 80 до 90 колебаний в минуту. Объемный расход стерильного воздуха, подаваемого на аэрацию, контролировали с помощью ротаметра РМ-1; величина расхода составляла от 0,9 до 1,0 л/мин. Стерильность воздуха достигалась путем применения в системе фильтр-капсулы Sartopore 2 с размером пор 0,2 мкм [13].

В экспериментальном и контрольном режимах провели по пять циклов культивирования. Результаты изучения динамики накопления чумного микроба штамма EV при культивировании в одноразовых полимерных контейнерах и бутылках вместимостью 20 л показаны на рис. 2.

Как следует из рис. 2, общая концентрация клеток при выращивании посевной культуры чумного микроба штамма EV в одноразовом полимерном контейнере более чем в 2 раза превысила таковую при культивировании в бутылках. Значение этого показателя с применением одноразового полимерного контейнера достигло максимума на 27-й час роста, тогда как регламентный процесс был продолжительнее и составил 48 ч. Длительность лаг-фазы при культивировании в регламентном режиме превышала таковую в экспериментальном на 6 ч. Фаза экспоненциального роста в регламентном режиме культивирования также являлась более продолжительной (на 12 ч), чем в экспериментальном режиме. Различия во времени накопления бактерий в культуре обусловлены особенностями гидродинамических процессов в одноразовом полимерном контейнере и бутылки. Регламентный процесс предусматривал барботаж, а экспериментальный, дополнительно, – перемешивание, что значительно улучшало турбулизацию и насыщение кислородом микробной культуры.

Орбитальные колебания способствовали эффективному течению массообменных процессов при «мягком» динамическом воздействии на механолабильные клетки посевной культуры чумного микроба штамма EV [14, 15].

По завершении выращивания оценивали качество посевной культуры, определяя следующие показатели: pH, общую концентрацию микробных клеток, количество живых микробных клеток, наличие посторонней микрофлоры.

Результаты оценки качества посевной культуры чумного микроба штамма EV, полученной в 20-литровой бутылки и одноразовом полимерном контейнере, представлены в табл. 1.

Данные табл. 1 свидетельствуют о соответствии нормативным показателям качества изучаемых посев-

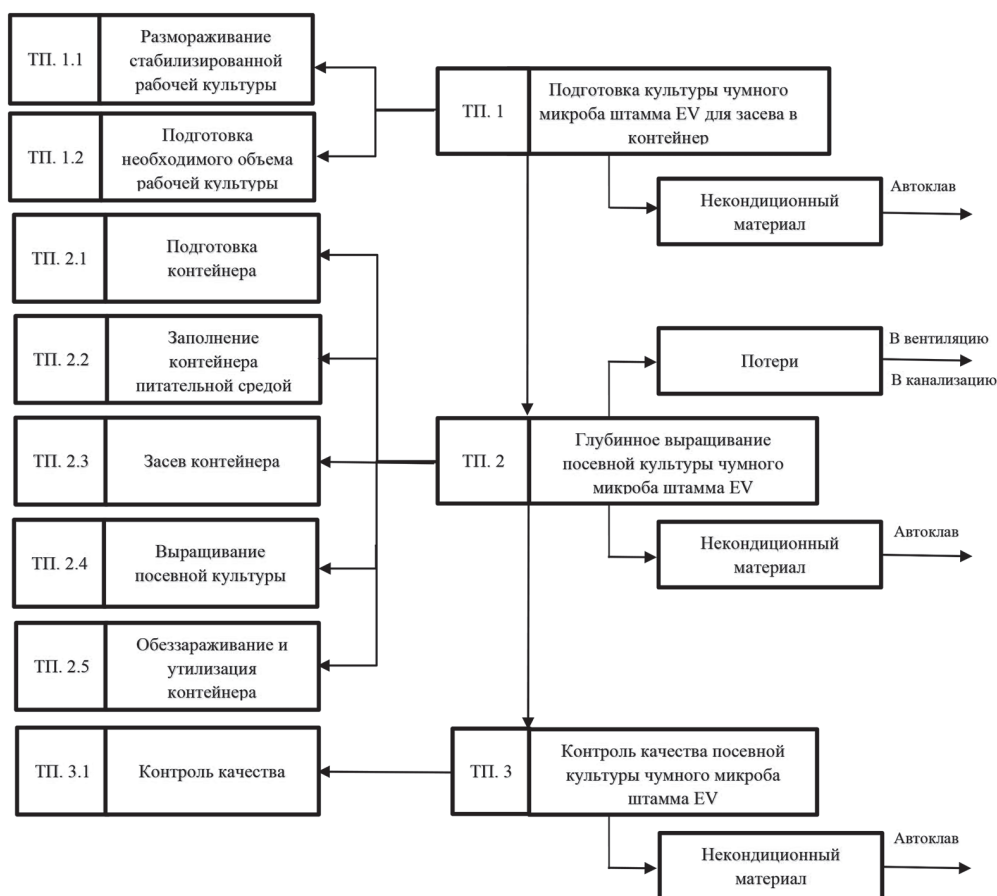


Рис. 1. Технологическая схема получения посевных культур чумного микроба штамма EV при культивировании в одноразовом полимерном контейнере

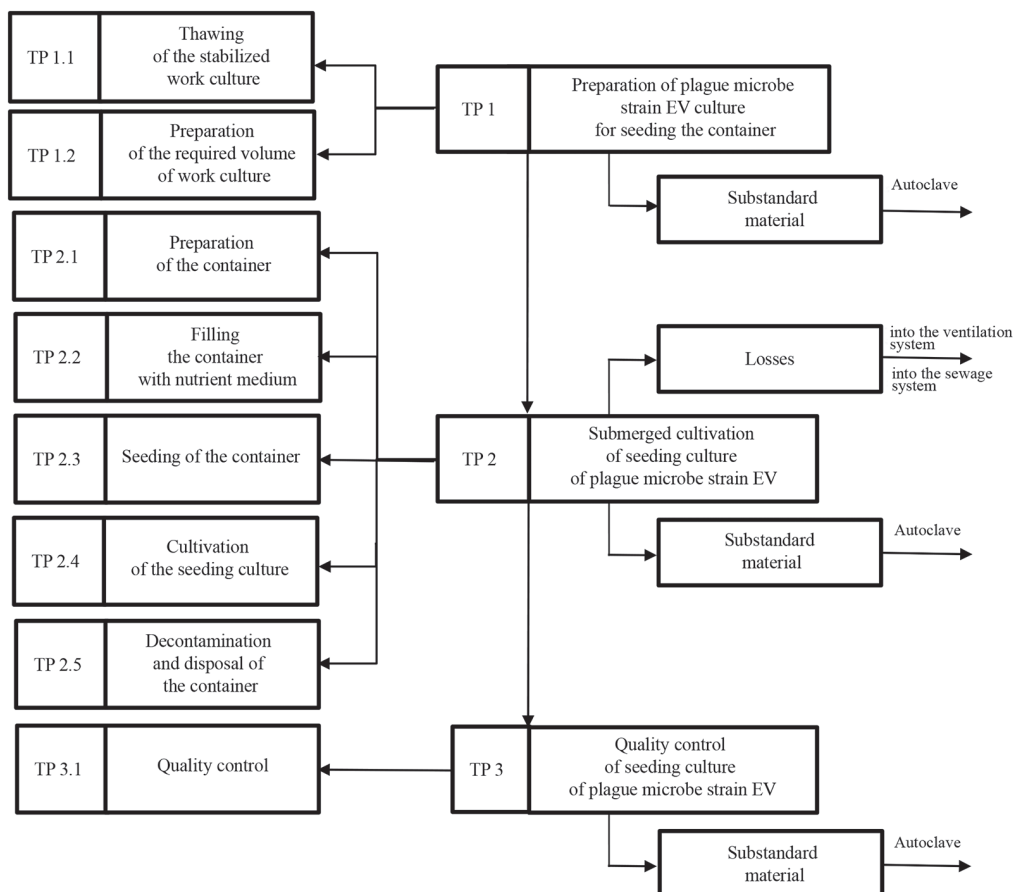


Fig. 1. Process flow diagram of cultivation seed culture of the plague microbe strain EV in disposable polymeric container

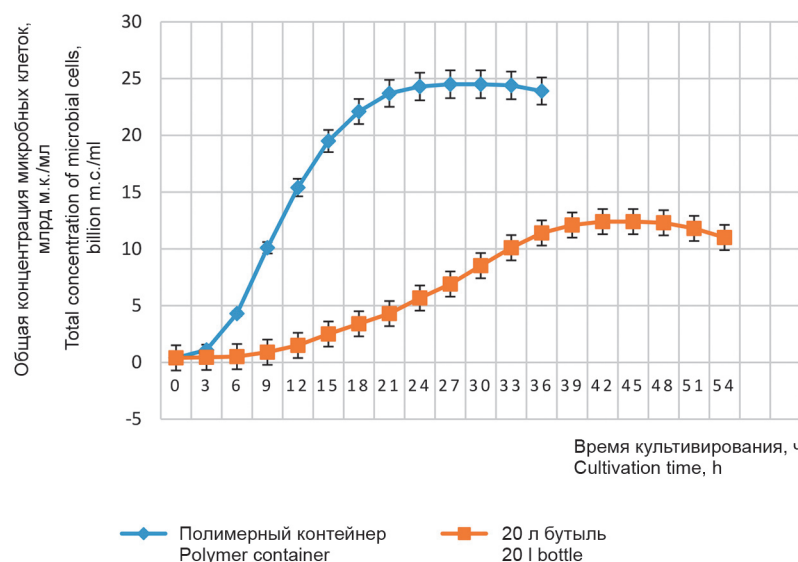


Рис. 2. Динамика накопления чумного микроба штамма EV при культивировании в одноразовых полимерных контейнерах и бутылках вместимостью 20 л ($\bar{X} \pm I_{95}$, $n=5$)

Fig. 2. Dynamics of accumulation of the plague microbe strain EV during cultivation in disposable polymeric containers and bottles with a capacity of 20 l ($\bar{X} \pm I_{95}$, $n=5$)

ных культур чумного микроба штамма EV, полученных как в бутылках объемом 20 л, так и в одноразовом полимерном контейнере. Значения общей концентрации микробов и количества живых микробных клеток в посевной культуре, приготовленной в одноразовом полимерном контейнере, превышали таковые при использовании бутылок объемом 20 л. В связи с тем, что объемы выращиваемой биомассы экспериментальным способом и регламентным были разными (для одноразового полимерного контейнера объем составил 5 л, для бутылки – 10 л), представлялось целесообразным оценить эффективность обоих процессов путем составления материального баланса.

Результаты сравнительной оценки материального баланса на этапе приготовления разными способами посевной культуры в производстве вакцины чумной живой представлены в табл. 2.

Как следует из табл. 2, несмотря на меньший объем посевной культуры, выращенной в одноразовом полимерном контейнере, общее содержание живых микробных клеток в данном случае больше, чем при использовании бутылки объемом 20 л, на $18,5 \cdot 10^{12}$ ж.м.к., что составляет 29 %. Данный факт свидетельствует о том, что количества живых микробных клеток в посевной культуре, выращенной в одноразовом полимерном контейнере, достаточно для осуществления дальнейшего технологического этапа – глубинного культивирования чумного микроба штамма EV в ферментере БИОР-0,25. Применение одноразового полимерного контейнера позволило сократить продолжительность стадии получения посевной культуры в 1,7 раза и увеличить выход живых микробов с единицы объема питательной среды в 2,8 раза.

Таблица 1 / Table 1

Результаты оценки качества посевной культуры чумного микроба штамма EV, полученной различными способами ($\bar{X} \pm I_{95}$, $n=5$)

The results of assessing the quality of the seed culture of the plague microbe strain EV obtained by various methods ($\bar{X} \pm I_{95}$, $n=5$)

Наименование показателя, единица измерения Indicator, unit of measure	Требования нормативной документации* Requirements of regulatory documents*	Значения показателя для посевной культуры, полученной способом ... Values of the indicator for the seeding culture obtained using the ... technology	
		регламентным regulated	экспериментальным experimental
Общая концентрация микробных клеток, млрд м.к./мл The total concentration of microbial cells, billion m.c./ml	6,0, не менее 6.0, not less	13,0 $\pm$ 1,0	24,0 $\pm$ 2,0
Количество живых микробных клеток, млрд ж.м.к./мл The number of living microbial cells, billion m.c./ml	3,0, не менее 3.0, not less	4,5 $\pm$ 0,9	12,7 $\pm$ 1,3
pH, ед. pH, units	от 7,4 до 7,9 7.4 to 7.9	7,6 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,1
Отсутствие посторонних микроорганизмов Absence of foreign microorganisms	Не должна содержать посторонних микроорганизмов Should not contain foreign microorganisms	Не содержит посторонних микроорганизмов Does not contain foreign microorganisms	

Примечание: * ПР 08461522-23-14. Промышленный регламент на производство вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, ингаляций и накожного скарификационного нанесения.

Note: * Manufacturing specifications (master formula) 08461522-23-14. Manufacturing specifications for the production of a live plague vaccine, lyophilizate for the preparation of a suspension for injections, inhalations and skin scarification.

Таблица 2 / Table 2

Результаты сравнительной оценки материального баланса получения посевной культуры экспериментальным и регламентным способами в производстве вакцины чумной живой ($\bar{X}$, n=5)

The results of comparative assessment of the material balance of obtaining a seeding culture using experimental and regulated technologies in the production of live plague vaccine ($\bar{X}$, n=5)

Способ получения посевной культуры, продолжительность Method of obtaining a seeding culture, duration	Объем, л Volume, l	Количество живых микробных клеток, ж.м.к./мл The number of live microbial cells, live m.c./ml	Общее количество живых микробных клеток в объеме, ж.м.к. The total number of living microbial cells in the volume, live m.c.
Экспериментальный, 27 ч Experimental, 27 hours	5,0	12,7·10 ⁹	63,5·10 ¹²
Регламентный, 48 ч Regulated, 48 hours	10,0	4,5·10 ⁹	45,0·10 ¹²

Таким образом, результаты исследований показывают возможность и перспективность использования одноразовых полимерных контейнеров в технологии производства вакцины чумной живой на стадии получения посевной культуры.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Микшис 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.
2. Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Старцева О.Л., Катунина Л.С., Ковалев Д.А., Иванова Г.Ф., Костроминов А.В., Курилова А.А. Изучение влияния экспериментальных основ на ростовые качества жидких питательных сред для глубинного культивирования вакцинного штамма чумного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 1:71–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-71-76.
3. Шаров Д.А., Лещенко А.А., Багин С.В., Логвинов С.В., Ежов А.В., Лазыкин А.Г., Мохов Д.А., Крупин В.В., Зиганшин А.Р. Совершенствование технологии производства вакцины чумной живой. *Вестник войск РХБ защиты*. 2017; 1(3):30–8.
4. Verma S.K., Tuteja U. Plague vaccine development: current research and future trends. *Front. Immunol.* 2016; 7:602. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00602.
5. Сравнение применения одноразовых и классических исполнений ферментеров. [Электронный ресурс]. URL: <https://bio-rus.ru/stati/sravnenie-primeneniya-odnorazovyix-i-klassicheskix-ispolnenij-fermenterov.html> (дата обращения 01.03.2023).
6. Jagschies G., Lindskog E., Lacki K., Galliher P.M., editors. *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*. Elsevier; 2017. 1308 p.
7. Junne S., Neubauer P. How scalable and suitable are single-use bioreactors? *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018; 53:240–7. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.04.003.
8. Pazmiño M.F., Terán V.A., Calderón S.J., Gaona K.V., Mihai R., Pais-Chanfrau J.M., Trujillo L.E. Single-use systems bioreactors in the biopharmaceutical industry and its use in SARS-CoV-2 candidate vaccine production – A review. *Prensa Med. Argent.* 2021. 107(6):348. DOI: 10.47275/0032-745X-348.
9. FlexboyR 2D Pre-designed solution for storage. [Электронный ресурс]. URL: <https://sartoros.ru/biotechnology/flexboy/> (дата обращения 12.03.2023).
10. Краснюк И.И., Михайлова Г.В., редакторы. *Практикум по технологии лекарственных форм*. М.: Академия; 2010. 432 с.
11. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. 384 с.
12. Goswami S., Raval K., Anjana, Bhat Pr. Recent trends in conventional and nonconventional bioprocessing. In: Sudhir P. Singh, Santosh Kumar Upadhyay, editors. *Bioprospecting of Microorganism-Based Industrial Molecules*. 2021. P. 404–17. DOI: 10.1002/9781119717317.ch20.

13. Комиссаров А.В., Морозов К.М., Перепелица А.И., Ульянов А.Ю., Волох О.А., Никифоров А.К. Обеззараживание биологических аэрозолей в удаляемом газе при проведении стадии ферментации биотехнологического процесса. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 4:6–15. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-6-15.
14. Сазыкин Ю.Ю., Орехов С.Н., Чакалева И.И., Катлинский А.В. (редактор). *Биотехнология*. М.: Академия; 2014. 256 с.
15. Винаров А.Ю., Гордеев Л.С., Кухаренко А.А., Панфилов В.И., Быков В.А. (редактор). *Процессы и аппараты биотехнологии: ферментационные аппараты*. М.: Юрайт; 2019. 274 с.

References

1. Mikshis N.I., Kutyrev 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.
2. Abzaeva N.V., Gostishcheva S.E., Startseva O.L., Katunina L.S., Kovalev D.A., Ivanova G.F., Kostrominov A.V., Kurilova A.A. [Studying the effect of experimental bases on the growth quality of liquid nutritional media for submerged cultivation of plague microbe vaccine strain]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (1):71–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-71-76.
3. Sharov D.A., Leshchenko A.A., Bagin S.V., Logvinov S.V., Ezhov A.V., Lazykin A.G., Mokhov D.A., Krupin V.V., Ziganshin A.R. [The improvement of live plague vaccine production technology]. *[Bulletin of NBC Protection Corps]*. 2017; 1(3):30–7.
4. Verma S.K., Tuteja U. Plague vaccine development: current research and future trends. *Front. Immunol.* 2016; 7:602. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00602.
5. [Comparison of the use of disposable and conventional modifications of fermenters]. (Cited 01 Mar 2023). [Internet]. Available from: <https://bio-rus.ru/stati/sravnenie-primeneniya-odnorazovyix-i-klassicheskix-ispolnenij-fermenterov.html>.
6. Jagschies G., Lindskog E., Lacki K., Galliher P.M., editors. *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*. Elsevier; 2017. 1308 p.
7. Junne S., Neubauer P. How scalable and suitable are single-use bioreactors? *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018; 53:240–7. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.04.003.
8. Pazmiño M.F., Terán V.A., Calderón S.J., Gaona K.V., Mihai R., Pais-Chanfrau J.M., Trujillo L.E. Single-use systems bioreactors in the biopharmaceutical industry and its use in SARS-CoV-2 candidate vaccine production – A review. *Prensa Med. Argent.* 2021. 107(6):348. DOI: 10.47275/0032-745X-348.
9. FlexboyR 2D Pre-designed solution for storage. (Cited 12 Mar 2023). [Internet]. Available from: <https://sartoros.ru/biotechnology/flexboy/>.
10. Krasnyuk I.I., Mikhailova G.V., editors. [Workshop on the Technology of Dosage Forms]. Moscow: “Academy”; 2010. 432 p.
11. Trukhacheva N.V. [Mathematical Statistic in Biomedical Research Using the “Statistica” Software Package]. Moscow: “GEOTAR-Media”; 2013. 384 p.
12. Goswami S., Raval K., Anjana, Bhat Pr. Recent trends in conventional and nonconventional bioprocessing. In: Sudhir P. Singh, Santosh Kumar Upadhyay, editors. *Bioprospecting of Microorganism-Based Industrial Molecules*. 2021. P. 404–17. DOI: 10.1002/9781119717317.ch20.
13. Komissarov A.V., Morozov K.M., Perepelitsa A.I., Ul'yanov A.Yu., Volokh O.A., Nikiforov A.K. [Disinfection of biological aerosols in the removed gas during the fermentation stage of the biotechnological process]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii*

[*Problems of Particularly Dangerous Infections*]. 2020; (4):6–15.
DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-6-15.

14. Sazykin Yu.Yu., Orekhov S.N., Chakaleva I.I., Katlinsky A.V. (editor). *Biotechnology*. M.: “Academy”; 2014. 256 p.

15. Vinarov A.U., Gordeev L.S., Kukharensky A.A., Panfilov V.I.; Bykov V.A. (editor). [Processes and Devices of Biotechnology: Fermentation Bioreactors: Tutorial for Academic Undergraduate]. Moscow: “Urait”; 2019. 274 p.

Authors:

Sharov D.A., Darmov I.V., Kosenkov I.V., Leshchenko A.A., Bagin S.V., Mokhov D.A., Lazykin A.G., Kovalenko E.A. Affiliated Branch of the “48th Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation. 119, Oktyabrsky Avenue, Kirov, 610000, Russian Federation. E-mail: 23527@mil.ru.

Об авторах:

Шаров Д.А., Дармов И.В., Косенков И.В., Лещенко А.А., Багин С.В., Мохов Д.А., Лазыкин А.Г., Коваленко Е.А. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров). Российская Федерация, 610000, Киров, Октябрьский проспект, 119. E-mail: 23527@mil.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-156-159

УДК 616.98:578.834.1(470.344)

Н.П. Прищепа, Н.Ю. Добровольская, В.И. Никифорова, Т.С. Тарасова, Е.В. Преображенская

Выявление мутаций гена S SARS-CoV-2 методом ПЦР в сезоны повышенной заболеваемости коронавирусной инфекцией в Чувашской Республике

ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Чебоксары, Российская Федерация

Мутации в геноме SARS-CoV-2 позволяют эффективно преодолевать многие защитные механизмы организма, чем и объясняется распространение инфекции среди вакцинированных или ранее переболевших людей. **Цель** работы – исследовать динамику мутаций в геноме вируса SARS-CoV-2 в период повышения сезонной заболеваемости в Чувашской Республике. **Материалы и методы.** В условиях клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава России (г. Чебоксары) методом ОТ-ПЦР исследованы пробы, взятые в январе – феврале и июле – октябре 2022 г., в которых обнаружена РНК SARS-CoV-2. Использовали «МБС-Тест SARS-CoV-2 РНК» (ТУ 21.20.23-068-26329720-2021, Россия) и «АмплиТест SARS-CoV-2 VOC v.3» (серия V017, РУ № РЗН 2022/16307, Россия) в соответствии с инструкциями по применению. **Результаты и обсуждение.** В исследованных пробах, полученных в разные периоды распространения коронавируса SARS-CoV-2 на территории Чувашской Республики в 2022 г., выявлены различия в совокупностях мутаций гена S SARS-CoV-2. В Чувашии, как и в России в целом, в начале 2022 г. вариант дельта был вытеснен вариантом омикрон, продолжающим активно мутировать с появлением множества новых вариантов.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, дельта, омикрон, мутации белкового шипа, обратная транскрипция, ПЦР-амплификация.

Корреспондирующий автор: Прищепа Надежда Петровна, e-mail: fc@orthoscheb.ru.

Для цитирования: Прищепа Н.П., Добровольская Н.Ю., Никифорова В.И., Тарасова Т.С., Преображенская Е.В. Выявление мутаций гена S SARS-CoV-2 методом ПЦР в сезоны повышенной заболеваемости коронавирусной инфекцией в Чувашской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023; 4:156–159. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-156-159

Поступила 29.05.2023. Отправлена на доработку 16.06.2023. Принята к публ. 06.07.2023.

N.P. Prishchepa, N.Yu. Dobrovol'skaya, V.I. Nikiforova, T.S. Tarasova, E.V. Preobrazhenskaya

Detection of SARS-CoV-2 S Gene Mutations Using PCR during Seasons of Increased Incidence of Coronavirus Infection in the Chuvash Republic

Federal Center for Traumatology, Orthopedics, and Endoprosthetics of the Ministry of Health of the Russian Federation, Cheboksary, Russian Federation

Abstract. Mutations in the SARS-CoV-2 genome make it possible to effectively escape defense mechanisms of the host, which explains the spread of infection among vaccinated or previously affected by the virus individuals. **The aim** of the study was to investigate the dynamics of mutations in the SARS-CoV-2 virus genome during the rise of the seasonal incidence in the Chuvash Republic. **Materials and methods.** Under conditions of the clinical diagnostic laboratory of the Federal Center for Traumatology, Orthopedics and Endoprosthetics of the Ministry of Health of Russia (Cheboksary), samples, containing SARS-CoV-2 RNA, taken in January-February and July-October, 2022 were tested using reverse transcription PCR. The “MBS-Test SARS-CoV-2 RNA” (Technical Specifications 21.20.23-068-26329720-2021, Russia) and “AmpliTest SARS-CoV-2 VOC v.3” (Series V017, Certificate of Registration No. 2022/16307, Russia) were utilized in compliance with the manufacturer's instructions. **Results and discussion.** Variations in the sets of SARS-CoV-2 S gene mutations have been revealed in the studied samples obtained during different periods of the spread of SARS-CoV-2 coronavirus. Timely detection of various mutations in the virus genome at the beginning of the epidemiological season and the alleged rise in the incidence of coronavirus infection is valuable information for forecasting the rate of virus transmission. It can also be used to create vaccines (taking into account changes in the virus genome) and to choose the adequate tactics for treating coronavirus infection.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, Delta, Omicron, spike protein mutations, reverse transcription, PCR amplification.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Nadezhda P. Prishchepa, e-mail: fc@orthoscheb.ru.

Citation: Prishchepa N.P., Dobrovol'skaya N.Yu., Nikiforova V.I., Tarasova T.S., Preobrazhenskaya E.V. Detection of SARS-CoV-2 S Gene Mutations Using PCR during Seasons of Increased Incidence of Coronavirus Infection in the Chuvash Republic. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:156–159. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-156-159

Received 29.05.2023. Revised 16.06.2023. Accepted 06.07.2023.

Prishchepa N.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5763-0711>
Dobrovolskaya N.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8786-4316>
Nikiforova V.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4574-943X>

Tarasova T.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0207-6581>
Preobrazhenskaya E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3556-145X>

В соответствии с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) Комитет по чрезвычайным ситуациям ВОЗ в январе 2020 г. объявил вызванную коронавирусом 2019-nCoV эпидемию «чрезвычайной ситуацией в здравоохранении, имеющей международное значение» [1]. Пандемия COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, привела более чем к 270 млн случаев инфицирования и 5,3 млн смертей во всем мире [2]. ВОЗ предложила выделять варианты SARS-CoV-2, вызывающие обеспокоенность (VOC – variant of concern), и варианты, вызывающие интерес (VOI – variant of interest) [3]. В список VOC вошли альфа (B.1.1.7), бета (B.1.351), гамма (P.1), дельта (B.1.617.2). 28 ноября 2021 г. ВОЗ дополнила этот перечень вариантом омикрон (B.1.1.529). В России в разное время были выявлены все вышеперечисленные варианты SARS-CoV-2.

На данный момент самым распространенным вариантом коронавируса является B.1.1.529, характеризующийся большим количеством мутаций белкового шипа, и его подварианты, основные из которых: BA.1 (B.1.1.529.1) и BA.2 (B.1.1.529.2), BA.3 (B.1.1.529.3), BA.4, BA.5, BA.2.75. Мутации новых подвариантов способствуют ускользанию от иммунитета, что вызывает обеспокоенность в аспекте повторного заражения и прорывной инфекции среди выздоровевшего или вакцинированного населения [4–7]. Появление постоянно развивающихся вариантов предполагает необходимость создания комбинированных антител и вакцинных антигенов [8].

В Российской Федерации лабораторные исследования на COVID-19 проводятся в соответствии с приказом Министерства здравоохранения РФ от 18.05.2021 № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований». Для выявления SARS-CoV-2 используется метод амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) (без накопления возбудителя) с применением зарегистрированных в установленном порядке тест-систем в соответствии с инструкциями по их применению. Зарегистрированные тест-системы дают возможность выявлять наличие различных мутаций в геноме вновь появляющихся штаммов SARS-CoV-2, что представляет научный интерес и имеет практическое значение для оценки влияния генных изменений на течение заболевания и модернизацию вакцин против SARS-CoV-2. Существует острая необходимость в вариантном фенотипировании для эпидемиологического надзора за циркулирующими линиями [9].

Цель работы – исследовать динамику мутаций в геноме вируса SARS-CoV-2 в период повышения сезонной заболеваемости в Чувашской Республике.

Материалы и методы

Исследования проводились в условиях клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава России (г. Чебоксары). Материалом исследования послужили 153 положительные пробы биологического материала пациентов – жителей Чувашской Республики, в том числе 89 проб взято в январе – феврале 2022 г., 64 пробы – в июле – октябре 2022 г. Медиана возраста пациентов за январь – февраль – 43,8 года (от 3 до 83 лет), за июль – октябрь – 40,6 года (от 1 до 81 года). Мужчин за январь – февраль – 42,7 %, женщин – 57,3 %, за июль – октябрь – 42,2 и 57,8 % соответственно.

Исследование для выделения РНК SARS-CoV-2 в мазках из носо- и ротоглотки проводилось с помощью набора реагентов для выделения и качественного выявления РНК SARS-CoV-2 методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в реальном времени «МБС-Тест SARS-CoV-2 РНК» (ТУ 21.20.23-068-26329720-2021, Россия). Экстракция РНК производилась комплектом реагентов «АмплиТест Рибо-преп» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России) РУ № РЗН 2020/12985 в соответствии с инструкцией производителя. ОТ-ПЦР выполнялась набором «АмплиТест SARS-CoV-2 VOC v.3» (серия V017, РУ № РЗН 2022/16307, Россия). Набор позволяет проводить качественное выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 – генетических вариантов, вызывающих обеспокоенность (VOC), омикрон и дельта путем выявления характерных для данных вариантов мутаций в гене *S* коронавируса. Принцип тестирования основан на проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК вируса SARS-CoV-2, включающих маркерные мутации в гене *S*. Набор позволяет выявлять в гене *S* SARS-CoV-2 мутации A67V, del69–70, P681H, N679K, сочетание которых характерно для варианта омикрон и его потомков (B.1.1.529, BA.1), мутации P681R и L452R, сочетание которых характерно для варианта дельта SARS-CoV-2 и его потомков (B.1.617.2, AY), а также определять наличие каждой из указанных мутаций в отдельности.

Выявление мутации коронавируса SARS-CoV-2 для одного образца проводилось в двух пробирках. В ходе исследования в режиме реального времени использовался амплификатор Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия).

Результаты и обсуждение

Выявление в клиническом образце нуклеотидной последовательности SARS-CoV-2, содержащей

мутации P681H, N679K, A67V и del69-70, характерные для варианта омикрон, или сочетания мутаций P681R и L452R, характерные для варианта дельта, интерпретируется как выявление генетических маркеров соответствующих вариантов омикрон или дельта SARS-CoV-2. В случае выявления одного из этих сочетаний мутаций рекомендуется провести дальнейшее исследование образца методом автоматического секвенирования кДНК для определения наличия спектра других генетических маркеров, которые в совокупности с указанными мутациями определяют принадлежность к соответствующим генетическим вариантам омикрон или дельта. Ввиду отсутствия технической возможности секвенирование кДНК нами не проводилось.

В исследованных пробах, полученных в различные периоды распространения коронавируса SARS-CoV-2 в 2022 г., отмечаются различия в совокупностях мутаций гена *S* SARS-CoV-2. В период с января по февраль 2022 г. выявлены в 91,01 % случаев мутации гена *S* SARS-CoV-2, характерные для генетического варианта омикрон, в 2,25 % случаев – мутации гена *S* SARS-CoV-2, характерные для генетического варианта дельта, в 6,74 % случаев – характерные для генетического варианта омикрон, но без мутации A67V и делеции 69-70del в гене *S* SARS-CoV-2. В период с июля по октябрь 2022 г. в 100 % случаев выявлены мутации гена *S* SARS-CoV-2, характерные для генетического варианта омикрон, но с присоединением мутации L452R в гене *S* SARS-CoV-2.

По данным исследования аминокислотные замены L452R и P681R в S-белке оказались высококонсервативными для варианта дельта (B.1.617.2) и являются его отличительной чертой [10].

Группа ученых из Японии показала, что концентрация РНК вируса при заражении подвариантом омикрон BA.2 в дыхательных путях выше по сравнению с подвариантом омикрон BA.1, в том числе в легких, и подтвердила потенциальную возможность повторного заражения вариантом BA.2 после перенесенной инфекции, вызванной штаммом BA.1 [10]. Однако предварительные данные от исследовательской группы из Дании (новостное сообщение сайта <https://fmha.gov.ru/> от 18.03.2022) показали, что общее количество госпитализаций при распространении варианта BA.2 не увеличивалось.

К июлю 2022 г. стали доминировать новые подварианты вируса SARS-CoV-2 омикрон – BA.4 и BA.5, имеющие две хорошо известные и встречавшиеся ранее мутации в S-белке: делеция NV69-70 (встречалась в вариантах альфа, бета и омикрон BA.1) и мутация L452R (определялась в варианте дельта). L452R отвечает за ускользание штамма от антител. Ряд исследований показал, что если в омикрон вернуть мутацию L452R, то этот штамм вновь приобретет способность к более высокой инфекционности, что может сделать его более опасным для легких [11].

Постоянный мониторинг геномов SARS-CoV-2 на предмет мутаций критически важен для нашего понимания его эволюции и воздействия на здоровье человека, а также необходим для распознавания изменений вирусных эпитопов, которые потребовали бы модификации вакцины [12, 13]. Поскольку испытания лекарств и вакцин продолжаются, крайне важно принимать во внимание мутации SARS-CoV-2 и их соответствующие частоты, поскольку эти данные могут проложить путь к комбинированию нескольких лекарств [14, 15].

Итак, в исследовании проведена оценка мутаций в РНК SARS-CoV-2 в период повышенной сезонной заболеваемости в Чувашской Республике. Полученные данные отображают динамику распространения вариантов вируса SARS-CoV-2 на территории республики в 2022 г. В Чувашии, как и в России в целом, в начале 2022 г. вариант дельта был вытеснен вариантом омикрон, продолжающим активно мутировать с появлением множества новых вариантов.

Своевременное проведение исследований мутаций в геноме SARS-CoV-2 является ценной информацией для мониторинга скорости распространения инфекции, отслеживания формирования географических штаммов SARS-CoV-2, что позволяет устанавливать источники заносов из-за рубежа, определять свойства вируса и корректировать тест-системы для диагностики в случае необходимости.

На основании вышесказанного считаем целесообразным более широкое проведение исследований мутаций в геноме SARS-CoV-2 аккредитованными лабораториями медицинских организаций.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

References / Список литературы

1. Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV). 30 January 2020. WHO. (Cited 31 May 2023). [Internet]. Available from: [https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov)).
2. Lupala C.S., Ye Y., Chen H., Su X.D., Liu H. Mutations on RBD of SARS-CoV-2 Omicron variant result in stronger binding to human ACE2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022; 590:34–41. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.12.079.
3. Hirabara S.M., Serdan T.D.A., Gorjao R., Masi L.N., Pithon-Curi T.C., Covas D.T., Curi R., Durigon E.L. SARS-COV-2 variants: differences and potential of immune evasion. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022; 11:781429. DOI: 10.3389/fcimb.2021.781429.
4. Motozono C., Toyoda M., Zahradnik J., Saito A., Nasser H., Tan T.S., Ngare I., Kimura I., Uriu K., Kosugi Y., Yue Y., Shimizu R., Ito J., Torii S., Yonekawa A., Shimono N., Nagasaki Y., Minami R., Toya T., Sekiya N., Fukuhara T., Matsuura Y., Schreiber G.; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; Ikeda T., Nakagawa S., Ueno T., Sato K. SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity. *Cell Host Microbe.* 2021; 29(7):1124–1136.e11. DOI: 10.1016/j.chom.2021.06.006.
5. Wang Q., Guo Y., Iketani S., Nair M.S., Li Z., Mohri H., Wang M., Yu J., Bowen A.D., Chang J.Y., Shah J.G., Nguyen N., Chen Z., Meyers K., Yin M.T., Sobieszczyk M.E., Sheng Z., Huang Y.,

- Liu L., Ho D.D. Antibody evasion by SARS-CoV-2 Omicron sub-variants BA.2.12.1, BA.4 and BA.5. *Nature*. 2022; 608(7923):603–8. DOI: 10.1038/s41586-022-05053-w.
6. Zhao X., Zhang R., Qiao S., Wang X., Zhang W., Ruan W., Dai L., Han P., Gao G.F. Omicron SARS-CoV-2 neutralization from inactivated and ZF2001 vaccines. *N. Engl. J. Med.* 2022; 387(3):277–80. DOI: 10.1056/NEJMc2206900.
7. Deng X., Garcia-Knight M.A., Khalid M.M., Servellita V., Wang C., Morris M.K., Sofomayor-González A., Glasner D.R., Reyes K.R., Gliwa A.S., Reddy N.P., Sanchez San Martin C., Federman S., Cheng J., Balcerek J., Taylor J., Streithorst J.A., Miller S., Sreekumar B., Chen P.Y., Schulze-Gahmen U., Taha T.Y., Hayashi J.M., Simoneau C.R., Kumar G.R., McMahon S., Lidsky P.V., Xiao Y., Hemarajata P., Green N.M., Espinosa A., Kath C., Haw M., Bell J., Hacker J.K., Hanson C., Wadford D.A., Anaya C., Ferguson D., Frankino P.A., Shivram H., Lareau L.F., Wyman S.K., Ott M., Andino R., Chiu C.Y. Transmission, infectivity, and neutralization of a spike L452R SARS-CoV-2 variant. *Cell*. 2021; 184(13):3426–3437.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2021.04.025.
8. Ou J., Wu J., Zhang Q. Structural insights into the Omicron spike trimer: tackling the challenges of continuously evolving SARS-CoV-2 variants. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022; 7(1):322. DOI: 10.1038/s41392-022-01179-5.
9. Chung H.Y., Jian M.J., Chang C.K., Lin J.C., Yeh K.M., Chen C.W., Hsieh S.S., Hung K.S., Tang S.H., Perng C.L., Chang F.Y., Wang C.H., Shang H.S. Emergency SARS-CoV-2 variants of concern: novel multiplex real-time RT-PCR assay for rapid detection and surveillance. *Microbiol. Spectr.* 2022; 10(1):e0251321. DOI: 10.1128/spectrum.02513-21.
10. Saito A., Irie T., Suzuki R., Maemura T., Nasser H., Uriu K., Kosugi Y., Shirakawa K., Sadamasu K., Kimura I., Ito J., Wu J., Iwatsuki-Horimoto K., Ito M., Yamayoshi S., Loeber S., Tsuda M., Wang L., Ozono S., Butlertanaka E.P., Tanaka Y.L., Shimizu R., Shimizu K., Yoshimatsu K., Kawabata R., Sakaguchi T., Tokunaga K., Yoshida I., Asakura H., Nagashima M., Kazuma Y., Nomura R., Horisawa Y., Yoshimura K., Takaori-Kondo A., Imai M.; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; Tanaka S., Nakagawa S., Ikeda T., Fukuhara T., Kawaoka Y., Sato K. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature*. 2022; 602(7896):300–6. DOI: 10.1038/s41586-021-04266-9.
11. Ou J., Lan W., Wu X., Zhao T., Duan B., Yang P., Ren Y., Quan L., Zhao W., Seto D., Chodosh J., Luo Z., Wu J., Zhang Q. Tracking SARS-CoV-2 Omicron diverse spike gene mutations identifies multiple inter-variant recombination events. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022; 7(1):138. DOI: 10.1038/s41392-022-00992-2.
12. Zhang Y., Zhang T., Fang Y., Liu J., Ye Q., Ding L. SARS-CoV-2 spike L452R mutation increases Omicron variant fusogenicity and infectivity as well as host glycolysis. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022; 7(1):76. DOI: 10.1038/s41392-022-00941-z.
13. Boehm E., Kronig I., Neher R.A., Eckerle I., Vetter P., Kaiser L.; Geneva Centre for Emerging Viral Diseases. Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic. *Clin. Microbiol. Infect.* 2021; 27(8):1109–17. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.05.022.
14. Badua C.L.D.C., Baldo K.A.T., Medina P.M.B. Genomic and proteomic mutation landscapes of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.* 2021; 93(3):1702–21. DOI: 10.1002/jmv.26548.
15. Cosar B., Karagulleoglu Z.Y., Unal S., Ince A.T., Uncuoglu D.B., Tuncer G., Kilinc B.R., Ozkan Y.E., Ozkoc H.C., Demir I.N., Eker A., Karagoz F., Simsek S.Y., Yasar B., Pala M., Demir A., Atak I.N., Mendi A.H., Bengi V.U., Cengiz Seval G., Gunes Altuntas E., Kilic P., Demir-Dora D. SARS-CoV-2 mutations and their viral variants. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2022; 63:10–22. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2021.06.001.

Authors:

Prishchepa N.P., Dobrovol'skaya N.Yu., Nikiforova V.I., Tarasova T.S., Preobrazhenskaya E.V. Federal Center for Traumatology, Orthopedics, and Endoprosthetics. 33, Fedora Gladkova St., Cheboksary, 428020, Russian Federation. E-mail: fc@orthoscheb.ru.

Об авторах:

Прищепа Н.П., Добровольская Н.Ю., Никифорова В.И., Тарасова Т.С., Преображенская Е.В. Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования. Российская Федерация, 428020, Чебоксары, ул. Федора Гладкова, 33. E-mail: fc@orthoscheb.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-160-162

УДК 616.932:614.8

А.В. Тюрина¹, Н.Е. Гаевская¹, Е.А. Синельник², И.А. Иванова¹, А.В. Филиппенко¹, Н.Д. Омельченко¹,
А.А. Труфанова¹, М.П. Погожова¹, А.О. Аноприенко¹, Н.И. Пасюкова¹

Оценка безопасности смеси холерных бактериофагов на модели экспериментальных животных

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

²ГБУ РО «Областная клиническая больница № 2», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Распространение штаммов *Vibrio cholerae*, обладающих множественной антибиотикостойчивостью, обуславливает необходимость поиска альтернативных антибиотикам средств. Такими средствами могут стать холерные бактериофаги. **Цель** работы – изучение безопасности смеси холерных бактериофагов на модели экспериментальных животных. **Материалы и методы.** В работе использовали композицию на основе холерных фагов Rostov-M3, Rostov-13, FB1. Проведена оценка токсичности препарата, цитотоксического и апоптогенного влияния на экспериментальных животных. **Результаты и обсуждение.** Показано, что однократное введение максимальной определенной дозы смеси фагов не вызывает негативного воздействия на организм лабораторных животных. Сравнение с контролем не показало статистически достоверных отличий гистологической картины в органах опытных животных после длительного введения препарата. Также после однократного и повторного семидневного приема данные фаги не вызывают апоптоза и некроза иммунокомпетентных клеток экспериментальных животных. Результаты данных исследований свидетельствуют о безопасности 3-компонентной фаговой композиции и в перспективе могут быть использованы для дальнейшей разработки новых биопрепаратов на основе холерных бактериофагов.

Ключевые слова: бактериофаги, профилактика холеры, аномальная и хроническая токсичность, апоптогенное и цитотоксическое влияние.

Корреспондирующий автор: Тюрина Анна Владимировна, e-mail: tyurina.anuta2010@yandex.ru.

Для цитирования: Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Синельник Е.А., Иванова И.А., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А., Погожова М.П., Аноприенко А.О., Пасюкова Н.И. Оценка безопасности смеси холерных бактериофагов на модели экспериментальных животных. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023; 4:160–162. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-160-162

Поступила 09.06.2023. Отправлена на доработку 04.09.2023. Принята к публ. 23.11.2023.

A.V. Tyurina¹, N.E. Gaevskaya¹, E.A. Sinel'nik², I.A. Ivanova¹, A.V. Filippenko¹, N.D. Omel'chenko¹,
A.A. Trufanova¹, M.P. Pogozhova¹, A.O. Anoprienko¹, N.I. Pasyukova¹

Assessment of Cholera Bacteriophages Mixture Safety on an Experimental Animal Model

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

²Regional Clinical Hospital No. 2, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The spread of *Vibrio cholerae* strains with multiple antibiotic resistance necessitates the search for alternatives to antibiotics. Cholera bacteriophages can become such means. **The aim** of the work was to study the safety of a mixture of cholera bacteriophages using an experimental animal model. **Materials and methods.** We used a composition based on cholera phages Rostov-M3, Rostov-13, FB1. The toxicity of the drug, cytotoxic and apoptogenic effects in experimental animals were assessed. **Results and discussion.** It has been shown that a single administration of the maximum defined dose of the mixture of phages does not cause negative effects on the body of laboratory animals. Comparison with the control group has not revealed statistically significant differences in the histological picture in the organs of the experimental animals after long-term administration of the drug. Also, after a single and repeated seven-day administration, these phages do not cause apoptosis and necrosis of immune competent cells in experimental animals. The results of the studies indicate the safety of the 3-component phage composition and can be used for the further development of new biological products based on cholera bacteriophages in the future.

Key words: bacteriophages, cholera prevention, abnormal and chronic toxicity, apoptogenic and cytotoxic effects.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Bioethics: All stages of the research complied with the legislation of the Russian Federation, international ethical standards and regulatory documents of the institution, and were also approved by the bioethics commission of the Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor.

Corresponding author: Anna V. Tyurina, e-mail: tyurina.anuta2010@yandex.ru.

Citation: Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Sinel'nik E.A., Ivanova I.A., Filippenko A.V., Omel'chenko N.D., Trufanova A.A., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O., Pasyukova N.I. Assessment of Cholera Bacteriophages Mixture Safety on an Experimental Animal Model. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:160–162. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-160-162

Received 09.06.2023. Revised 04.09.2023. Accepted 23.11.2023.

Tyurina A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9359-3997>
Gaevskaya N.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0762-3628>
Sinel'nik E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2201-5065>
Ivanova I.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7068-4071>
Filippenko A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1103-4244>

Omel'chenko N.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5208-7724>
Trufanova A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4770-5994>
Pogozhova M.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9779-3577>
Anoprienko A.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8466-9315>
Pasyukova N.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1525-5693>

В результате широкого распространения антибиотикостойчивости *Vibrio cholerae* заболевание холерой представляет серьезную проблему для современного здравоохранения [1]. В связи с этим сохраняет актуальность проблема расширения арсенала профилактических средств, обладающих направленным бактерицидным действием в отношении холерных вибрионов. В качестве одного из таких средств рассматриваются бактериофаги [2].

Основными преимуществами фагопрофилактики являются отсутствие побочных эффектов, совместимость с любыми фармакологическими препаратами, безопасность приема во время беременности, возможность применения пациентами с аллергическими реакциями, стимуляция факторов специфического и неспецифического иммунитета [3]. Также фагопрофилактика показана детям до двух лет, что является важным аспектом при разработке средств лечения и профилактики инфекционных болезней [4].

Одним из важных критериев разработки новых фармакологических препаратов, в том числе и фаговых, является проведение токсикологических исследований на здоровых животных, так как выявление патологий, развивающихся в результате введения исследуемого вещества, позволяет получить дополнительную информацию о его токсичности для корректировки дозы и состава.

Целью нашей работы стало изучение аномальной (острой) и хронической (подострой) токсичности смеси холерных бактериофагов, апоптогенного и цитотоксического влияния на иммунокомпетентные клетки экспериментальных животных.

Материалы и методы

В работе использовалась фаговая композиция, в состав которой вошли холерные бактериофаги Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 из коллекции-депозитария лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Изучение свойств бактериофагов проводили общепринятыми методами [5].

Фаги, взятые в эксперимент, подвергали стерилизующей фильтрации с помощью насадки Filtropur S 0,22 мкм. Очистку от эндотоксинов проводили на хроматографической колонке Endo Trap HD (Германия) согласно инструкции производителя. После фильтрации фаги были соединены в равных соотношениях.

Все стадии исследований соответствовали законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения, а также были одобрены комиссией по биоэтике ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Для статистической обработки все эксперименты проводили в трех повторях.

Для проведения опыта по оценке аномальной токсичности в эксперимент взяты беспородные бе-

лые мыши с массой тела 18–20 г. Животных разделили на три группы по 10 особей. Фаговую композицию (Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1) вводили экспериментальным животным разными способами в максимальной определенной (опытной) дозе [6] в концентрации $n \cdot 10^8$ – $n \cdot 10^9$ БОЕ/мл. Испытуемое средство вводили животным однократно, первой группе – по 1,0 мл внутривенно, второй группе – по 0,5 мл подкожно в область задней лапы, третьей группе – 0,5 мл *per os*. Также исследование аномальной токсичности было выполнено на четырех здоровых кроликах (2–2,5 кг). Данным животным перорально вводили одну разовую максимальную определенную (опытную) дозу испытуемого препарата по 10,0 мл ($n \cdot 10^8$ – $n \cdot 10^9$ БОЕ/мл). За испытуемыми наблюдали в течение 14 суток. Контрольные группы животных получали перорально забуференный раствор натрия хлорида (ЗФР) 0,9 % в объемах, аналогичных опытным группам.

Эксперимент по оценке хронической (подострой) токсичности проведен на 20 здоровых белых мышках (20–24 г). Первой группе (10 животных) продукт вводили внутривенно один раз в день по 0,5 мл ($n \cdot 10^8$ – $n \cdot 10^9$ БОЕ/мл) в течение 15 дней. Второй группе (10 животных) препарат вводили внутривенно в той же дозе один раз в день по 0,5 мл в течение 21 дня. Контрольные группы получали перорально ЗФР в том же объеме. У взятых в опыт животных ежедневно проводили осмотр на наличие клинических симптомов общей интоксикации, а также измеряли массу тела (протокол заседания Комиссии по биоэтике от 25.03.2021 № 3).

По окончании сроков наблюдения (15-й и 21-й день) проводили эвтаназию белых мышей с соблюдением требований биоэтики, после чего осуществляли их вскрытие. Полученные паренхиматозные органы и их фрагменты сразу фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине. Подготовка гистологических препаратов проводилась по стандартной методике [7]. Тканевые образцы заключали в парафин и с помощью микротомы получали полутонкие срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологическое исследование проводилось на моторизованном микроскопе Leica DM 6000 (Германия).

Для оценки апоптогенной и цитотоксической активностей взрослым кроликам (три группы по два кролика весом 1,5 кг) внутривенно через зонд вводили по 3 мл смеси бактериофагов (Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1) в концентрации $n \cdot 10^8$ – $n \cdot 10^9$ БОЕ/мл в течение 7 дней. Контрольным животным вводили раствор натрия хлорида 0,9 % в объемах, аналогичных опытным группам. Забор крови осуществляли из ушной вены кролика в вакуумные пробирки с гепарином. Цельную кровь окрашивали реагентами из набора Annexin V (eBioscience, США). На проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США) проводили подсчет относительно количества жизнеспособных клеток в состоянии

апоптоза и некроза, оценивали не менее 10 тыс. событий (протокол заседания Комиссии по биоэтике от 08.06.2021 № 5).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). Значения доверительных интервалов среднеарифметического (М) определяли для уровня достоверности (Р) 95 %. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$. Для выявления достоверности различий между независимыми выборками использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Как значимый оценивался уровень $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Оценка аномальной и хронической токсичности на двух экспериментальных моделях показала, что при любом способе введения однократной максимально определенной для животных дозы испытуемые фаги не являются токсичными, так как признаков интоксикации у мышей и кроликов не наблюдали. Также установлено, что при длительном пероральном приеме коктейля бактериофагов внешний вид и привес мышей, поведенческие реакции в экспериментальной и контрольной группах не отличались.

Исследование гистологических препаратов органов, взятых для исследования на 15-е и 21-е сутки эксперимента, не выявило патологических изменений, значимых для здоровья животных. Анализ полученных данных показал, что количество животных в опытных группах, имеющих изменения в органах, достоверно не отличалось от такового в контрольных группах.

Оценка цитотоксического и апоптогенного влияния смеси холерных фагов на форменные элементы крови взрослых кроликов показала, что прием данного коктейля в течение 7 дней не вызывает увеличения количества иммунокомпетентных клеток в состоянии апоптоза и не оказывает цитотоксического эффекта. Количество жизнеспособных моноцитов, лимфоцитов, нейтрофилов у опытных животных статистически не отличалось от аналогичных показателей контрольных групп кроликов. Такая же тенденция сохранялась и после повторного введения (в течение 7 дней) смеси бактериофагов этой группе кроликов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о безопасности смеси холерных фагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 для экспериментальных животных и, после оценки ее профилактической эффективности, могут быть использованы для разработки экспериментального профилактического фагового препарата, способного расширить возможности профилактических мероприятий против холеры.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Биоэтика. Все стадии исследований соответствовали законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения, а также были одобрены комиссией по биоэтике ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Список литературы

1. Das B., Verma J., Kumar P., Ghosh A., Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*. 2020; 1:A83–A92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031.
2. Kakasis A., Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2019; 53(1):16–21. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004.
3. Ильина Т.С., Толордава Э.Р., Романова Ю.М. Взгляд на фаготерапию через 100 лет после открытия бактериофагов. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2019; 37(3):103–12. DOI: 10.17116/molgen201937031103.
4. Хавкин А.И., Алешкин А.В., Зейгарник М.В. Перспективы фаготерапии при болезнях органов пищеварения у детей. *Вопросы практической педиатрии*. 2018; 13(4):82–90. DOI: 10.20953/1817-7646-2018-4-82-90.
5. Адамс М. Бактериофаги. М.; 1961. 527 с.
6. Хабриев Р.У., редактор. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина; 2005. 832 с.
7. Прудников В.С., Луппова И.М., Жуков А.И., Федотов Д.Н. Организация гистологических исследований, техника изготовления и окраски гистопрепаратов. Витебск; 2011. 28 с.

References

1. Das B., Verma J., Kumar P., Ghosh A., Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*. 2020; 1:A83–A92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031.
2. Kakasis A., Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2019; 53(1):16–21. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004.
3. Il'ina T.S., Tolordava E.R., Romanova Yu.M. [A view on the phage therapy 100 years after the discovery of bacteriophages]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2019; 37(3):103–12. DOI: 10.17116/molgen201937031103.
4. Khavkin A.I., Aleshkin A.V., Zeigarnik M.V. [Prospects for phage therapy in case of digestive system diseases in children]. *Voprosy Prakticheskoy Pediatrii [Clinical Practice in Pediatrics]*. 2018; 13(4):82–90. DOI: 10.20953/1817-7646-2018-4-82-90.
5. Adams M. [Bacteriophages]. Moscow; 1961. 527 p.
6. Khabriev R.U., editor. [Guidelines for Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances]. Moscow: "Medicine"; 2005. 832 p.
7. Prudnikov V.S., Luppova I.M., Zhukov A.I., Fedotov D.N. [Organization of Histological Studies, Techniques for Making and Staining Histological Preparations]. Vitebsk; 2011. 28 p.

Authors:

Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Ivanova I.A., Filippenko A.V., Omel'chenko N.D., Trufanova A.A., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O., Pasyukova N.I. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.
Sinel'nik E.A. Regional Clinical Hospital No. 2. 33, 1st Cavalry Army St., Rostov-on-Don, 344029, Russian Federation.

Об авторах:

Тюрин А.В., Гаевская Н.Е., Иванова И.А., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А., Погужова М.П., Аноприенко А.О., Пасюкова Н.И. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.
Синельник Е.А. Областная клиническая больница № 2. Российская Федерация, 344029, Ростов-на-Дону, ул. 1-й Конной Армии, 33.