

УДК 616.928:616.036.221

**Е.Ю. Киселева, Н.В. Бренева, А.К. Носков, М.Б. Шаракшанов, С.В. Балахонов, Н.Г. Гефан****МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛЕПТОСПИРОЗОВ: ОСОБЕННОСТИ ПОСТАНОВКИ, ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ****ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск, Россия**

Современная лабораторная диагностика лептоспирозов базируется на комплексе методов, которые используют в различных комбинациях в зависимости от задач и возможностей лабораторий. При всем разнообразии многие из них на практике не применяются.

Для достижения наилучших результатов необходимо усовершенствовать имеющиеся лабораторные методы и использовать их на практике. Особенное внимание следует уделить внедрению новых молекулярных технологий, которые упрощают лабораторную диагностику и расширяют ее возможности.

**Ключевые слова:** лептоспироз, лабораторная диагностика

**METHODS FOR LEPTOSPIROSIS LABORATORY DIAGNOSTICS: FEATURES OF EXPERIMENTATION, ADVANTAGES AND LIMITATIONS****Ye.Yu. Kiseleva, N.V. Breneva, A.K. Noskov, M.B. Sharakshanov, S.V. Balakhonov, N.G. Gefan****Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor, Irkutsk, Russia**

Leptospirosis is a cosmopolitan natural-focal disease representing a serious problem for the majority of the countries in the world including the Russian Federation because this infection causes a serious economic and social damage.

Modern laboratory diagnostics of leptospiroses is based on a complex of bacteriological, immunological and molecular-biological methods used in various combinations depending on the problems and possibilities of the laboratories. At all variety, many methods are not applied in practice and the gold standard still remains the routine serological method. Disease diagnostics is based on a set of epidemiological, epizootological, clinical and pathoanatomical data with obligatory laboratory verification of the diagnosis. However often laboratory verification is retrospective or in general absent.

For achievement of the best results in leptospirosis diagnostics, it is necessary to improve the available laboratory methods and to use it in practice. Especial attention should be given to introduction of new molecular technologies that simplify laboratory diagnostics and expand its possibilities.

**Key words:** leptospirosis, laboratory diagnostics

Изучение лептоспирозной инфекции, начатое около 90 лет назад, продолжается и в настоящее время, поскольку лептоспирозы играют важную роль в инфекционной патологии людей, а также домашних и промысловых животных. Во многих странах мира лептоспирозы причиняют серьезный экономический и социальный ущерб [1, 9, 10, 25, 29].

В настоящее время установлено, что лептоспирозы представляют собой единую нозологическую форму, но тяжесть заболевания, обусловленная лептоспирами различных серогрупп, может существенно отличаться [8, 9]. Несмотря на многочисленные исследования, некоторые вопросы патогенеза, иммуногенеза, механизмы формирования тяжелых форм и осложнений до сих пор остаются неизученными [8]. Полиморфизм клинических проявлений, сходство симптомов с таковыми при других бактериальных и вирусных инфекциях, частые проявления болезни в атипичной форме нередко ведут к поздней диагностике и несвоевременному этиотропному лечению, что не удовлетворяет клиническую практику [6, 8, 21, 30].

Диагностика лептоспироза у людей, сельскохозяйственных и диких животных основывается на совокупности эпизоотолого-эпидемиологических, клинических и патологоанатомических данных с

обязательным подтверждением диагноза лабораторными исследованиями [6, 9, 10, 21].

Преобладание случаев бессимптомного течения болезни, сложность дифференциальной диагностики, отсутствие выраженных проявлений инфекции у животных-лептоспираносителей выдвигают лабораторные методы исследований на первое место в диагностике лептоспироза. Лишь хорошо организованная лабораторная диагностика позволяет своевременно диагностировать лептоспирозную инфекцию, планировать и проводить эффективные противозoonотические и противоэпидемические мероприятия [9, 10]. Что касается больных, то нередко диагноз устанавливается на основании клинико-эпидемиологических данных, а лабораторное подтверждение чаще всего носит ретроспективный характер или совсем отсутствует.

Современная лабораторная диагностика лептоспироза базируется на комплексе микробиологических, иммунологических и молекулярно-биологических методов [15, 21]. Их используют в различных комбинациях в зависимости от фазы заболевания и диагностических возможностей лабораторий (табл. 1). Постановка тех или иных реакций требует наличия в лаборатории специального оборудования, необходимого набора материалов, реагентов и обученного персонала.

Методы лабораторной диагностики лептоспирозов

Метод исследования	Мишень	Период болезни	Специфичность метода	Диагностические препараты, среды
Бактериологический метод	Возбудитель	Первая неделя (лептоспиремия)	Патогенные лептоспиры	Применяются, зарегистрированы
РМА	АТ	Вторая неделя – до нескольких месяцев	Серогрупповая	Применяются
Перекрестная РМА	Возбудитель	При выделении культуры	Серогрупповая	Применяются
ИФА, ИХА	АТ (Ig G)	Конец 2-й недели – до нескольких месяцев	Патогенные лептоспиры	Применяются, не зарегистрированы
ИФА, ИХА	АТ (Ig M)	Острый период	Патогенные лептоспиры	Применяются, не зарегистрированы
ПЦР в реальном времени	16 S рРНК	Первая неделя	Патогенные лептоспиры	Применяются, не зарегистрированы
Гнёздная ПЦР	LipL32	Первая неделя	Патогенные лептоспиры	Применяются в ветеринарии
МФА, ИФА, ИХА Магнимоносорбция Латекс-агглютинация	АГ	Первая неделя (лептоспиремия)	Зависит от задач	Разработка
РМА с панелью моноклональных антител	АГ	Идентификация культуры	Серовариант	Нидерланды, Референс-центр ВОЗ по лептоспирозам
Мультилокусное секвенирование (MLST)	Геномная ДНК	Идентификация культуры	Видовая (геномный вид)	Международный ресурс mlst.net
Прямое белковое профилирование на масс-спектрометре Microflex LT	Клеточные белки	Идентификация культуры	Видовая (геномный вид)	Применяется в Иркутском НИПЧИ
Мультиплексная лигазная реакция с гибридизацией	Геномная ДНК (SNP)	Идентификация культуры	Видовая (геномный вид)	Разработка

**БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА**

Бактериологическая диагностика основана на методах обнаружения лептоспир в исследуемом материале путем микроскопии и (или) выделения культур. Она складывается из следующих этапов:

- микроскопия в темном поле;
- бактериологический метод, включающий изоляцию лептоспир на специальных питательных средах и их идентификацию;
- биологический метод;
- дифференциация выделенных культур [9].

Особенность **бактериоскопического исследования** – это микроскопия в темном поле препарата «раздавленная капля», приготовленного из проб крови, мочи, ткани паренхиматозных органов. Наличие тонких, гибких, подвижных серебристых нитей с изогнутыми концами свидетельствует о присутствии в исследуемых образцах живых лептоспир [7, 9, 10, 21].

Отрицательные результаты бактериоскопии не дают основания для исключения диагноза. Нередко отбор проб для лабораторного исследования проводится на фоне антибиотикотерапии, в связи с чем диагностическая эффективность этого метода резко снижается. Не исключены и ошибки при бактериоскопическом методе исследования, которые связаны с дефектами покровного стекла, плохим освещением препарата, наличием в препарате нитей фибрина, стром эритроцитов или других извитых форм микроорганизмов [10, 21]. Для повышения диагностической эффективности прямой бактериоскопии, ее необходимо сочетать с такими серологическими методами, как метод флуоресцирующих антител, люминесцентная микроскопия.

Лептоспиры слабо окрашиваются анилиновыми красителями, в связи с чем для их обнаружения в орга-

нах и тканях используют окраску мазков-отпечатков по Романовскому – Гимза или импрегнацию серебром гистологических срезов по Вартину – Стерри. Применение этих приемов открывает дополнительные возможности обнаружения возбудителя в органах и тканях, а также позволяет оценить клеточную реакцию на их присутствие. Выявление лептоспир в тканях используется при подтверждении лептоспирозной природы заболеваний с летальными исходами [10].

Параллельно с бактериоскопическим методом используют **бактериологический метод**. Исследуемый материал (кровь, спинномозговая жидкость – СМЖ, моча) в количестве 5 капель засевают в 3–5 пробирок с питательной средой. Эту процедуру желательно проводить «у постели больного», потому что лептоспиры быстро погибают вне организма. Поскольку лептоспиры очень требовательны к качественному составу питательной среды, следует использовать лабораторную посуду из нейтрального или химического стекла. Новые и бывшие в употреблении пробирки обрабатываются 1–2%-м раствором соляной кислоты по определенной методике [21].

Для культивирования лептоспир используют **специальные питательные среды**. В зависимости от состава их подразделяют на:

1. Среда с нормальной кроличьей сывороткой (Ферворта – Вольфа, Стюарта, Кортхофа, Флетчера, Терских, ВГНКИ). В них содержатся высокие концентрации биологического витамина В12, что способствует росту лептоспир. Эти среды могут использоваться для изоляции возбудителя из клинических образцов и объектов окружающей среды, а также для хранения лептоспир и получения антигенов для постановки РМА.

2. Среды, содержащие жирные кислоты и альбумин (Эллингхаузена – МакКалоха – Джонсона – Харриса (ЕМ)Н), Эллиса, альбуминовая среда ГНКИ). В них длинноцепочечные жирные кислоты используются в качестве источника питания, а сывороточный альбумин – как детоксикант. Среды используются для изоляции культур и получения биомассы для проведения молекулярно-биологических исследований.

3. Среды, свободные от белка (Шенберга, синтетическая безбелковая среда). В этих средах длинноцепочечные жирные кислоты для детоксикации подвергаются воздействию древесного угля.

Разработаны полужидкие и плотные питательные среды, но для лабораторных исследований чаще используют жидкие питательные среды. Культуры лептоспир в жидких средах бесцветны, не имеют запаха, при обильном росте в пробирке наблюдаются опалесцирующие «муаровые» волны [21]. Поэтому для выявления роста лептоспир через 10 дней от момента посева из каждой пробирки готовят мазок «раздавленная капля» и микроскопируют в темном поле. Наибольший рост отмечается у поверхности среды.

При посевах лептоспир в полужидкий агар на 1–3 см ниже его поверхности образуются плоские диски роста или отдельно расположенные колонии. На полужидких средах культуры сохраняются дольше, однако для реакции агглютинации такие культуры не пригодны.

Плотные среды применяют для культивирования штаммов лептоспир, используемых в различных тестах, а также с целью клонирования лептоспир из смешанных культур. В зависимости от объема посевного материала рост может быть диффузным (в толще агара) или в виде субповерхностных колоний. Из многочисленных плотных питательных сред для культивирования лептоспир наиболее эффективны среды Кокса, В.С. Киктенко, С.Н. Канарейкиной и др. [9, 10].

Приготовленные среды должны отвечать определенным требованиям:

- отсутствие в сыворотке крови животных-доноров специфических антител к лептоспирам;
- применение химических веществ только марки «химически чистые», дистиллированной, бидистиллированной или деминерализованной воды;
- стерильность и полная прозрачность готовой среды, отсутствие посторонних частиц, кристаллов солей и т. д.;
- нейтральная или слабощелочная реакция среды (оптимум 7,2–7,6), хотя имеются и серогрупповые особенности [9, 21];
- содержание всех необходимых компонентов для роста и сохранения основных свойств лептоспир.

Лептоспиры являются аэробами и утилизируют длинные цепи жирных кислот в качестве источников углерода и энергии, вдобавок к длинноцепочечным жирным кислотам для их роста требуются витамины В<sub>1</sub>, В<sub>12</sub> и соли аммония [9, 10, 21]. Лептоспиры утилизируют пуриновые, но не пиримидиновые основания, поэтому они резистентны к антибактериальной активности аналога пиримидина 5-флуороурацила. Это

соединение используют как добавку к селективной среде (в концентрации 100 мкг/мл) для изоляции лептоспир из контаминированных источников [10, 21, 30].

В зависимости от биологических особенностей штамма и условий культивирования срок сохранения жизнеспособности культур, как правило, не превышает 3–6 месяцев. Для сохранения живых культур рекомендуется производить пересевы не реже 1 раза в месяц на свежеприготовленные питательные среды.

Рост отдельных серогрупп (*Hebdomadis javanica*) на обычных сывороточных средах скудный. Это связано с «индивидуальными требованиями» отдельных серогрупп к составу питательных сред [9].

Одним из признаков нормального развития лептоспир является активная подвижность. В одной и той же популяции короткие особи более подвижны, чем длинные. По величине и степени подвижности лептоспир нельзя сравнивать вирулентность различных штаммов, хотя культуры одного и того же штамма тем вирулентнее, чем больше мелких и подвижных лептоспир в определенном объеме среды. Срок утраты вирулентности весьма различен не только для отдельных серогрупп, но и для штаммов [9, 10].

К недостаткам бактериологического метода относятся длительное время культивирования, а также ряд технических сложностей выделения лептоспир:

- влияние на рост лептоспир химического состава стекла, из которого делают пробирки;
- необходимость очень тщательной (по особым правилам), обработки и мытья посуды;
- необходимость предварительного обследования кроликов, от которых берут сыворотку для приготовления сред;
- точное соблюдение последовательности и рецепта приготовления сред;
- точное соблюдение методики посева;
- тщательное наблюдение за ростом на протяжении не менее 3 месяцев.

При культивировании лептоспир необходимо исключить возможность загрязнения посторонней микрофлорой, поскольку жизнедеятельность других микроорганизмов приводит к образованию токсических продуктов, изменению рН среды и, как следствие, подавляет рост и приводит к гибели микроорганизмов [9].

**Классическая идентификация выделенных культур лептоспир.** Лептоспиры относятся к медленно растущим микроорганизмам, поэтому выделение культуры имеет значение только для ретроспективного подтверждения клинического диагноза, но, безусловно, необходимо для идентификации и изучения биологических свойств возбудителей, циркулирующих в различных очагах лептоспирозов [14, 21]. Выявление патогенных лептоспир в крови или в другом исследуемом материале абсолютно точно говорит о лептоспирозной этиологии заболевания [30].

Классическая идентификация состоит из следующих этапов:

1. Дифференциация патогенных и сапрофитических лептоспир.
2. Установление серогрупповой принадлежности.
3. Определение серовара.

**Дифференциация патогенных и сапрофитических лептоспир** проводится по биологическим и культурально-биохимическим свойствам. Для этого используют температурный и бикарбонатный тесты, а также резистентность к 8-азагуанину. Вследствие того, что лептоспиры являются медленно растущими организмами, недостатком этих тестов является длительность их постановки (от 7 до 21 дня). Для экспресс-дифференциации в настоящее время рекомендуется применять определение участков генов патогенных лептоспир методом ПЦР.

**Идентификацию до серогруппы** проводят с помощью коммерческих наборов типовых сывороток или методом перекрестной РМА, для постановки которой необходимо располагать гипериммунными специфическими сыворотками к эталонным штаммам лептоспир. Серогруппы не имеют официального таксономического статуса, основным таксоном лептоспир является серовар (серологическая классификация) [26]. Однако в связи с недоступностью методов идентификации до серовара, она не обязательна, при подтверждении диагноза достаточно указать серогруппу возбудителя [15].

Для определения серовара используют: абсорбционный тест перекрестной агглютинации; факторный анализ сыворотки; типирование с использованием панелей моноклональных антител, которые выпускает только один институт мира – Институт тропических болезней (Нидерланды, Референс-центр ВОЗ по лептоспирозам). В связи с тем, что методы внутривидовой дифференциации лептоспир достаточно сложны и трудоемки, выделенные от людей, животных или объектов окружающей среды культуры патогенных лептоспир в обязательном порядке в течение одного месяца направляются для подтверждения и расширенной идентификации в Референс-центр по мониторингу возбудителей природно-очаговых инфекций и Центр по лептоспирозам ФГБУ ФНИЦЭМ им. академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ [15, 21].

Для выделения культуры из исследуемого материала более эффективным является метод постановки биопроб. **Биологический метод** в диагностике лептоспирозов используют в учреждениях, имеющих специализированные помещения для работы с животными. Заражение животных материалом подозрительным на наличие лептоспир можно использовать с целью:

- выделения культур лептоспир из контаминированного посторонней микрофлорой материала (ткани органов, моча, вода открытых водоемов, почва и т. д.);
- очистки культур патогенных лептоспир от посторонней микрофлоры;
- определения вирулентности штаммов лептоспир;
- моделирования инфекционного процесса.

Универсальной лабораторной модели для диагностики и изучения лептоспирозов не существует, поскольку восприимчивость животных к заражению лептоспирами различных серогрупп варьирует в зависимости от их видовой принадлежности [9, 21]. При равных условиях молодые особи более восприимчивы к инфекции, чем взрослые животные того же вида. Симптомы и тяжесть заболевания у них более выражена.

Для иктерогеморрагического лептоспироза лабораторной моделью служат молодые морские свинки 4–5-недельного возраста весом 150–200 г. Инфекционный процесс у них протекает с клиническими проявлениями и патологоанатомическими изменениями, типичными для лептоспироза. К лептоспирам других серологических групп морские свинки менее восприимчивы и чувствительны. Без тяжелых клинических проявлений и часто без гибели лабораторных животных протекают лептоспирозы *Pomona*, *Hebdomadis*, *Bataviae*. К заражению лептоспирами серогруппы *Grippotyphosa* морские свинки относительно резистентны, поэтому для этой серогруппы используют золотистых хомячков в 20–25-дневном возрасте, весом 18–25 г. При заражении хомячков вирулентными штаммами серогрупп *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Sejroe*, *Grippotyphosa*, *Pomona* наблюдается картина желтушной формы лептоспироза [9].

Предлагаются и другие виды биопробных животных: суслики, щенки в возрасте до 4 недель, крольчата-сосунки в возрасте 15–30 дней, хлопковые крысы, крысовидные хомяки, песчанки, шиншиллы. Однако применение многих из перечисленных животных ограничено, во-первых, из-за возможной спонтанной зараженности лептоспирами или возбудителями других болезней, во-вторых, вследствие малой доступности и дороговизны [9].

Материалом для исследования в биологическом опыте служат: кровь, моча, СМЖ, ткани органов людей и животных, подозрительных на зараженность лептоспирами, а также вода, пищевые продукты и другие объекты окружающей среды. Исследуемый материал вводят животным внутрибрюшинно, подкожно, внутривенно, через скарифицированную кожу и слизистые оболочки. Доза заражения зависит от размера экспериментального животного: морские свинки, кролики, суслики – 1,5–2 мл, мелкие грызуны – 0,5–1 мл [9].

Клиническая картина и патологоанатомические изменения у различных животных сходны, особенно при тяжелом течении болезни. Инкубационный период в среднем составляет от 2 до 7 дней. Впоследствии у животных поднимается температура до 40–41 °С, они отказываются от корма, наблюдается снижение веса, активности, инъекция сосудов склер, шерсть животных взъерошена. Далее на фоне резкого истощения появляется желтушность склер и видимых слизистых, затем кожи на ушах и подушечках лапок, отмечается выпадение волос. Животные гибнут через 12–48 часов после появления желтухи на фоне гипотермии [9].

При вскрытии павших животных обнаруживается выраженная желтушность кожи, подкожной клетчатки, слизистых и всех органов, увеличение лимфатических узлов, геморрагические высыпания на коже и во внутренних органах, коже и подкожной клетчатке. Типичны крупноточечные кровоизлияния в легких на общем ишемическом фоне («крылья бабочки»). Отмечаются некротические очаги (в виде мелких белых пятен) в печени и в корковом слое почек (разрушение извитых канальцев и гломерул). Впоследствии развивается некротический нефроз-нефрит, который является причиной анурии и уремии, что и приводит к гибели лабораторного животного [9].



Возможно выздоровление экспериментального животного, если в ходе опыта использовали недостаточно инфицирующую дозу, слабо вирулентный штамм, или если у животного выражена высокая индивидуальная резистентность. В таких случаях инфекционный процесс протекает без желтухи и геморрагий, а животные становятся носителями лептоспир (бактерии размножаются в извитых канальцах почек и выделяются во внешнюю среду с мочой) до нескольких месяцев.

За подопытными животными, не погибшими от инфекции, наблюдают в течение месяца с момента заражения, после чего их умерщвляют с учетом требований биозащиты. Производят посевы из коркового слоя почек. Из сердца берут кровь (нативную или на фильтровальную бумагу) для исследования на наличие специфических антител. При недостаточной вирулентности лептоспир прибегают к пассированию от животного к животному, для этого используют кровь, брюшной экссудат, взвесь из тканей органов [9].

В полевых условиях в качестве биопроб можно использовать диких грызунов, которых не менее 15 дней выдерживают в карантине с обязательным 2–3-кратным исследованием крови на наличие антител, а мочи – на носительство лептоспир [9].

Кроме того, метод биологических проб на практике может быть применен для выделения возбудителя лептоспироза из увлажненной почвы, воды и ила водоемов в местах предполагаемого заражения людей и животных. При исследовании отобранных проб целесообразно проводить измерение рН, поскольку в среде с большими отклонениями от оптимума лептоспиры не выживают (оптимум 7,2–7,4) [9, 12].

#### СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

Ведущее место в лабораторной диагностике лептоспирозов принадлежит **серологическим методам**. С их помощью выявляют специфические антитела (АТ) в крови больных и переболевших, а также обнаруживают антигены лептоспир в биологических жидкостях. «Золотым стандартом» серологической диагностики лептоспироза считается реакция агглютинации-лизиса с живыми культурами лептоспир, которую разработали в 1927 г. Schuffner и Mochtaх [3, 5, 7, 21, 30]. В настоящее время, по рекомендации ВОЗ, применяют ее модификацию – **реакцию микроагглютинации (РМА) с набором эталонных культур**.

На территории Российской Федерации рекомендован стандартный набор типовых диагностических штаммов, который включает 15 представителей 10 серогрупп патогенных лептоспир [21]. Международный набор дополнительно содержит штаммы серогрупп лептоспир, ранее не выделявшихся в России.

Специфические антитела в крови больных обнаруживаются через 7–10 дней после заражения. Обычно к концу второй недели болезни титр антител повышается в 15–40 раз и выше и сохраняется в течение несколько недель. Помимо сроков заболевания необходимо учитывать применение антибиотиков, глюкокортикостероидов и специфического гаммаглобулина, которые могут тормозить выработку агглютининов.

В РМА также можно исследовать пробы крови больных людей или животных, высушенные на фильтровальной бумаге. В этом случае кровь в количестве 2 капель (каждая размером 15–20 мм) наносят на фильтровальную бумагу (1,5 × 1,5 см) и высушивают на воздухе при комнатной температуре. Для постановки реакции фильтровальную бумагу расстригают и опускают на дно лунки полистиролового планшета, добавляют 1,0 мл физиологического раствора. Полученный раствор служит основным разведением 1 : 10. Исследовать высушенный материал необходимо в срок, не превышающий 1 месяца с момента взятия крови при условии хранения его при комнатной температуре и в течение 6 месяцев – при условии хранения его в запаянном полиэтиленовом пакете в холодильнике при 4 °С.

С исследуемым материалом предварительно ставят ориентировочную реакцию РМА. Материал от грызунов исследуют в разведении 1 : 10, от людей для исключения феномена прозоны – в двух разведениях – 1 : 10 и 1 : 100. При положительной реакции материал оттитровывают с двукратным шагом для развернутой РМА. Для постановки РМА используют 6–14-дневные культуры лептоспир с хорошей подвижностью, без спонтанной агглютинации и посторонних примесей, с концентрацией, соответствующей 50–100 клеток в поле зрения микроскопа. Учет реакции проводят микроскопированием препаратов в темном поле полукочетвенным методом. Агглютинация проявляется в склеивании лептоспир и образовании конгломератов в виде «паучков», «бантиков», «кос». Свободные концы лептоспир сохраняют подвижность. Диагностически положительной считается агглютинация лептоспир на 3 и 2 креста (при отсутствии агглютинации в контроле) в любом разведении сыворотки. Каждую сыворотку исследуют референтными штаммами, определенных серогрупп патогенных лептоспир, циркулирующих в данной местности.

РМА обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Важнейшими факторами, определяющими специфичность РМА, являются чистота и идентичность антигенов. Последнюю контролируют в лабораториях не реже 2 раз в год с применением гипериммунных кроличьих антисывороток или моноклональных антител. РМА ретроспективна; по полученным результатам невозможно дифференцировать острое заболевание от перенесенного несколько лет назад. Однако РМА позволяет определить серогруппу возбудителя, что важно для проведения эпидемиологического расследования и целенаправленного поиска источника инфекции.

Основными недостатками РМА при лептоспирозе являются:

- значительные затраты времени и труда на ее постановку;
- необходимость применения большого количества антигенов лептоспир разных серогрупп;
- вариабельность качества используемых живых лептоспирозных антигенов;
- потенциальная опасность заражения специалистов, проводящих серологическое исследование;
- субъективность оценки результатов; возможность перекрестных реакций;

- технические сложности при одномоментном исследовании большого количества образцов.

**Реакция макроагглютинации на стекле (слайд-агглютинация)** используется для предварительного тестирования сывороток больных с подозрением на лептоспирозную инфекцию и массового скрининга. Техника постановки реакции проста, поэтому она может быть использована в лабораториях любого уровня оснащённости. Для постановки применяют родоспецифические антигены, например, слайд-антиген Лепто БАСА (ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи).

**Реакция агглютинации латексных или полимерных частиц** по чувствительности уступает РМА, но проще в постановке и позволяет получить результат в более короткий срок. Кроме того, агглютинины выявляются в более ранние сроки и в более высоком титре, чем в РМА. В качестве носителя наружных мембранных антигенов лептоспир используют латексные частицы или частицы поли-DL-лактид-полиэтиленгликоля.

**Реакцию связывания комплемента (РСК)** редко используют для серологической диагностики лептоспироза. Комплементсвязывающие антитела появляются у инфицированных серогруппами *Icterohaemorrhagiae* и *Canicola* животных через 4 дня после заражения, а через 9–10 недель они исчезают. Тест не позволяет дифференцировать серовары лептоспир [12].

С целью ранней диагностики лептоспирозов и серологического скрининга также используются более простые тесты с родоспецифическими антигенами лептоспир (иммуноферментный анализ и др.)

**Иммуноферментный анализ (ИФА)** – метод, в котором в качестве маркера используют ферменты. Благодаря простоте и высокой чувствительности, твердофазные иммуноферментные системы удобны для выявления иммунных комплексов. Применение в ИФА моноклональных антител позволяет повысить качество исследований, поскольку моноклоны обладают высокой специфичностью и одинаковой аффинностью. Преимущество этого теста состоит в том, что он позволяет дифференцировать свежий и давний случаи инфекции за счет обнаружения типов антител (IgM и IgG). Этот метод позволяет одномоментно исследовать большое количество образцов. Основным недостатком ИФА в том, что он требует местной стандартизации для выяснения обрыва титра, поскольку у инфицированных лиц IgM могут поддерживаться на низких уровнях в течение ряда лет.

**Метод флуоресцирующих антител (МФА)** предназначен для выявления лептоспир независимо от серогрупповой принадлежности в различном патологическом материале (кровь, паренхиматозные органы, трансудат, СМЖ, моча больных и павших животных) и объектов окружающей среды (вода, почва) [12]. Исследование проводится с использованием лептоспирозных сывороток в комплексе с антивидовой флуоресцирующей сывороткой. Подготовленные соответствующим образом мазки просматривают на люминесцентном микроскопе. Окрашенные флуоресцирующим глобулином лептоспир имеют зеленоватое равномерное свечение всей поверхности микроба

в отличие от контурного сияющего свечения других видов микроорганизмов. Диагноз устанавливают по морфологии лептоспир и интенсивности свечения, оцениваемого по системе трех крестов. Наряду с МФА в индикации лептоспир применяется и непрямой метод флуоресцирующих антител (НМФА), при постановке которого используются антивидовой лептоспирозный флуоресцирующий глобулин.

#### МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В последние годы развитие лабораторной диагностики инфекционных болезней идет в направлении разработки молекулярно-биологических методов. Для детекции и анализа ДНК лептоспир в настоящее время применяются полимеразная цепная реакция (ПЦР), анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ), мультилокусное секвенирование. С разработкой современных молекулярно-генетических технологий в настоящее время появилась генетическая классификация, которая не совпадает с серологической, штаммы одного сероварианта могут принадлежать к разным видам лептоспир. В новом определителе Берджи 2010 г. на основании анализа ДНК и 16S рРНК род *Leptospira* подразделяется на 19 видов, из них 8 патогенных, 6 промежуточных и 5 сапрофитических [8, 26].

**Метод ПЦР** используется как для индикации и идентификации лептоспир, так и для экспресс-диагностики лептоспироза [3, 5, 10, 17, 18, 19, 20, 21, 24]. В качестве исследуемого клинического материала используют пробы крови, мочи, СМЖ, кусочки паренхиматозных органов, почва, вода, ил, контаминированные лептоспирами [10].

Наиболее специфичными участками ДНК для лептоспир являются гены, кодирующие липопротеин наружной мембраны лептоспир Lip L32 и 16S РНК патогенных геновидов возбудителя [5, 7, 12, 18, 21].

В настоящее время можно констатировать замещение стандартной ПЦР с электрофоретической детекцией модификациями с флуоресцентной регистрацией накопления ДНК, преимущество которой заключается в высокой чувствительности и специфической детекции продуктов реакции в реальном времени с количественной оценкой. Однако ПЦР с электрофоретической детекцией все же необходима для наработки фрагментов ДНК с целью их дальнейшего детального исследования: клонирования, определения нуклеотидной последовательности [13, 16].

ПЦР-анализ характеризуется высокой специфичностью, чувствительностью и высокой диагностической эффективностью на первой неделе заболевания (начиная с 1-х суток), даже на фоне антибиотикотерапии [17]. В этой связи его можно рекомендовать как метод ранней экспресс-диагностики лептоспироза [5, 10, 14, 18]. При тяжелом течении инфекции на фоне отсроченного синтеза специфических антител ПЦР может быть отнесена к методам выбора для быстрого лабораторного подтверждения клинического диагноза. Необходимо учесть, что отрицательный результат ПЦР-анализа не является основанием для прекращения диагностического поиска, так как день начала бо-

лезни не всегда точно известен [21]. Диагностическая эффективность лабораторных исследований при лептоспирозах может быть значительно повышена за счет параллельного использования серологического теста (РМА) и ПЦР вне зависимости от фазы заболевания.

ВОЗ предлагает следующие молекулярно-генетические методы для характеристики лептоспир [30]:

- ПЦР с произвольным праймером (AP-PCR) или дактилоскопия произвольно амплифицированного полиморфной ДНК (RAPD);
- анализ с использованием эндонуклеаз рестрикции (REA);
- анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP);
- анализ полиморфизма длины амплифицированного фрагмента (AFLP);
- гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE);
- анализ секвенирования ДНК.

Для определения видовой идентификации и внутривидового типирования *Leptospira spp.* в настоящее время применяется **мультилокусное секвенирование** [23]. Это молекулярный анализ предварительно отобранного, клонированного и протестированного более простыми методами фрагмента ДНК. В процессе секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом формате. В итоге получают последовательности участков генов, целых генов, тотальной мРНК и даже полных геномов микроорганизмов. Полученные результаты сравнивают с данными, хранящимися в базах NCBI и *Leptospira.mlst.net*.

Перспективная методика видовой идентификации представителей рода *Leptospira* – MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight – времяпролетная с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией) **масс-спектрометрия** [27], которая может быть успешно использована в повседневной практике для быстрой и надежной идентификации микроорганизмов [11]. Этот метод отличается высокой чувствительностью, скоростью и низкой стоимостью расходных материалов. Для диагностики лептоспирозов этот метод окончательно не разработан, прежде всего, потому что лептоспиры растут только на специальных жидких питательных средах, выделение культуры очень длительно и трудоемко. Для анализа белковых спектров рекомендуется использовать семидневные культуры лептоспир, выращенные при 28 °С на среде EMJH и сконцентрированные центрифугированием [2, 27].

Для видовой идентификации лептоспир предложена **мультиплексная лигазная реакция** с гибридизацией (Multiplex Ligase Probe Amplification – MLPA), основанная на технологии check-points с определением до 25 нуклеотидных замен (SNP) в формате ДНК-микрочипа [22]. Существует более простой вариант MLPA в формате ПЦР в реальном времени (CHECK-MDR REAL-TIME PCR), где несколько фрагментированных лигазными ферментами участков генов бактерий одновременно нарабатываются в полимеразной реакции и детектируются.

Для молекулярного типирования лептоспирозных изолятов в целях эпидемиологического анализа и изучения географического распространения применяют **ПДРФ – анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов** [28].

Суть метода состоит в сравнении различных паттернов сегментации (полос), полученных в процессе обработки ферментами ДНК возбудителей. ПДРФ включает экстракцию ДНК из однородной популяции микроорганизмов, расщепление ДНК рестриктазами и электрофорез расщепленной ДНК в агарозном геле, для более полного анализа проводят блоттинг по Southern на нитроцеллюлозных мембранах и гибридизацию с использованием специфического зонда. Рестрикционный анализ – достаточно чувствительный метод. Полученные фрагменты высоко специфичны по своей молекулярной характеристике для каждого типа лептоспир. Сравнивая рестрикционные карты различных штаммов, возможно дифференцировать их на молекулярном уровне. ПДРФ, как и пульс-электрофорез (PFGE), является наиболее чувствительным методом для типирования, но длителен, трудоемок и требует больших количеств тотальной ДНК для анализа. Более доступны основанные на ПЦР методы, в том числе ПЦР-ПДРФ, основанный на рестрикционном анализе амплифицированных фрагментов ДНК [4, 28].

При всем разнообразии разработанных методов лабораторной диагностики лептоспироза многие из них на практике не применяются. Бактериологический анализ довольно сложен, трудоемок и далеко не всегда успешен. Для изоляции чистых культур наиболее эффективен метод биопробы, однако он технически выполним исключительно в лабораториях, имеющих специализированные помещения для работы с животными. Метод микроскопии в темном поле сравнительно прост и дает наиболее быстрый результат, но при малом количестве бактерий в исследуемом материале он не информативен. Серологические методы на обнаружение АТ ретроспективны, их применение возможно лишь со второй недели заболевания. Метод ПЦР хорошо зарекомендовал себя на практике, но имеющиеся высокочувствительные тест-системы до сих пор не сертифицированы.

Для достижения наилучших результатов в диагностике лептоспироза необходимо усовершенствовать имеющиеся на вооружении лабораторные методы. Особое внимание следует уделить внедрению новых молекулярно-генетических технологий, что значительно упрощает лабораторную диагностику и расширяет ее возможности.

#### ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Ананьина Ю.В. Эпидемиологические принципы профилактики лептоспирозов // Дезинфекционное дело. – 2007. – № 3. – С. 39–42.
- Ananjina YV (2007). Epidemiological principles of leptospiroses prophylaxis [Epidemiologicheskie principy profilaktiki leptospirozov]. *Dezinfekcionnoe delo*, 3, 39-42.
2. Бренева Н.В., Афанасьев М.В., Шаракшанов М.Б., Остяк А.С., Киселева Е.Ю., Самсонова А.П., Петров Е.М., Викторова Е.В., Балахонов С.В. MALDI-TOF масс-



спектрометрический анализ клеточных белков в идентификации представителей рода *Leptospira* // ЖМЭИ. – 2014. – № 4. – С. 36–43.

Brenea NV, Afanasjev MV, Sharakshyanov MB, Ostryak AS, Kiseleva EY, Samsonova AP, Petrov EM, Viktorova EV, Balakhonov SV (2014). MALDI-TOF mass-spectrometer analysis of cell proteins in identification of bacteria belonging to the genus *Leptospira* [MALDI-TOF mass-spektrometricheskij analiz kletochnyh belkov v identifikacii predstavitelej roda *Leptospira*]. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii*, 4, 36-43.

3. Ваганова А.Н., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К. Адаптация ПЦР для диагностики лептоспироза и эпидемиологического надзора за лептоспирозной инфекцией // Национальные приоритеты России. – 2011. – № 2 (5). – С. 162–164.

Vaganova AN, Stoyanova NA, Tokarevich NK (2011). PCR adaptation for leptospirosis diagnostics and epidemiological surveillance of leptospirosis infection [Adaptatsia PCR dlja diagnostiki leptospiroza i epidemiologitseskogo nadzora za leptospirosnoi infektsiej]. *Nacional'nye priority Rossii*, 2 (5), 162-164.

4. Ваганова А.Н., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К. ПДРФ различных генов лептоспир и выбор маркеров для генотипирования лептоспир путем рестрикционного анализа // Национальные приоритеты России. – 2009. – № 2. – С. 183–185.

Vaganova AN, Stoyanova NA, Tokarevich NK (2009). RFLP-analysis of various *Leptospira* genes and choice of markers for *Leptospira* genotyping using restriction analysis [PDRF razlichnyh genov leptospir i izbor markerov dlja genotipirovanija leptospir putem restrikcionnogo analiza]. *Nacional'nye priority Rossii*, 2, 183-185.

5. Ваганова А.Н., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К. Разработка ПЦР-тест системы на основе гена *cola* для выявления лептоспир в клиническом материале // ЖМЭИ. – 2011. – № 5. – С. 67–71.

Vaganova AN, Stoyanova NA, Tokarevich NK (2011). Development of PCR-test system on the basis of *cola* gene for *Leptospira* detection in clinical samples [Razrabotka PCR-test sistemi na osnove gena cola dlja vijavlenija leptospir v klinitseskom materiale]. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii*, 5, 67-71.

6. Дранкин Д.И., Годлевская М.В. Лептоспироз. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1988. – 272 с.

Drankin DI, Godlevskaya MV (1988). *Leptospirosis* [Leptospiroz], 272.

7. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство; изд. 2-е, перераб. и доп. / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 360 с.

Onishchenko GG, Kutyrinov VV (eds.) (2013). Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases: Practical guidance [Laboratornaya diagnostic opasnih infekcionnih bolezney], 360.

8. Лебедев В.В., Авдеев М.Г., Шубич М.Г., Ананьина Ю.В., Турьянов И.Х., Лучшев В.И. Иктерогеморрагический лептоспироз / Под ред. В.В. Лебедева. – Краснодар: Советская Кубань, 2001. – 208 с.

Lebedev VV, Avdeev MG, Shubich MG, Ananjina YV, Turjanov IH, Luchshev VI (2001). *icterohemorrhagic leptospirosis* [Ikterogemorragicheskij leptospiroz], 208.

9. Лептоспирозы людей и животных / Под ред. В.В. Ананьина. – М.: Медицина, 1971. – 352 с.

Ananjin VV (ed.) (1971). *Human and animal leptospiroses* [Leptospirozy ljudej i zhivotnyh], 352.

10. Малахов Ю.А., Панин А.Н., Соболева Г.Л. Лептоспироз животных. – М.: Медгиз, 2000. – 621 с.

Malakhov YA, Panin AN, Soboleva GL (2000). *Leptospirosis in animals* [Leptospiroz zhivotnyh], 621.

11. Маянский Н.А., Калакуцкая А.Н., Мотузова О.В., Ломинадзе Г.Г., Крыжановская О.А., Катосова Л.К. MALDI-TOF масс-спектрометрия в рутинной работе микробиологической лаборатории // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2011. – Т. 3, № 5. – С. 20–25.

Mayansky NA, Kalakutskaya AN, Motuzova OV, Lominadze GG, Kryzhanovskaya OA, Katosova LK (2011). MALDI-TOF mass spectrometry in routine of microbiological laboratory [MALDI-TOF mass-spektrometrija v rutinnoj rabote mikrobiologicheskoy laboratorii]. *Voprosy diagnostiki v pediatrii*, 3 (5), 20-25.

12. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского, О.К. Поздеева. – М.: ГЕОТАР МЕДИЦИНА, 1999. – 1200 с.

Pokrovsky VG, Pozdeev OK (eds.) (1999). *Medical microbiology* [Medicinskaja mikrobiologija], 1200.

13. Першина М.Ю., Шагинян И.А., Ананьина Ю.В., Прозоровский С.В. Анализ геномного полиморфизма лептоспир в полимеразной цепной реакции с произвольными праймерами // МГМВ. – 1998. – № 1. – С. 29–32.

Pershina MY, Shaginyan IA, Ananjina YV, Prozorovsky SV (1998). Analysis of *Leptospira* genome polymorphism in polymerase chain reaction with random primers [Analiz genomnogo polimorfizma leptospir v polimeraznoj cepnoj reakcii s proizvol'nymi prajmerami]. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*, 1, 29-32.

14. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник; 2-е изд. – М.: ГЭОТАР Медиа, 2007. – 816 с.

Pokrovsky VI, Pak SG, Briko NI, Danilkin BK (2007). *Infectious diseases and epidemiology: Textbook* [Infekzionnie bolezni i epidemiologiya], 816.

15. Профилактика лептоспирозной инфекции у людей: СП 3.1.7.2835-11. – М., 2011. – 19 с.

Prevention of leptospirosis infection in humans: SP 3.1.7.2835-11 [Profilaktika leptospiroznoj infekcii u ljudej] (2011), 19.

16. ПЦР «в реальном времени» / Под ред. Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 215 с.

Rebrikov DV (2009). *PCR in real time* [PCR «v realnom vremeni»], 215.

17. Самсонова А.П., Ананьина Ю.В. Применение ПЦР-анализа при исследовании лептоспирозов в регионах Сибири и Дальнего Востока // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – Т. 55, № 3. – С. 165–167.

Samsonova AP, Ananjina YV (2007). Using PCR-analysis in leptospiroses research in Siberian and Far Eastern regions [Primenenie PCR-analiza pri issledovanii leptospirozov v regionah Sibiri i Dal'nego Vostoka]. *Bjull. VSNC SO RAMN*, 3, 165-167.

18. Самсонова А.П., Петров Е.М., Ананьина Ю.В. Применение ПЦР-анализа при исследовании лепто-



спирозов в Европейской части России // Национальные приоритеты России. – 2009. – № 2. – С. 166–167.

Samsonova AP, Petrov EM, Ananjina YV (2009). Using PCR-analysis in leptospiroses examination in the European part of Russia [Primenenie PCR-analiza pri issledovanii leptospirozov v Evropejskoj chasti Rossii]. *Nacional'nye priority Rossii*, 2, 166-167.

19. Самсонова А.П., Петров Е.М., Лебедев В.В., Ананьина Ю.В. Индикация лептоспир в сыворотках крови больных лептоспирозом *Icterohaemorrhagiae* методом nested-ПЦР // Клин. лаб. диагн. – 2008. – № 9. – 46 с.

Samsonova AP, Petrov EM, Lebedev VV, Ananjina YV (2008). *Leptospira* indication in human blood serum from leptospirosis *Icterohaemorrhagiae* patients using nested-PCR method [Indikacija leptospir v syvorotkah krovi bol'nyh leptospirozom Icterohaemorrhagiae metodom nested-PCR]. *Klin. lab. diagn.*, 9, 46.

20. Шагинян И.А., Ананьина Ю.В., Токарская О.Н., Тартаковский И.С., Брюханов А.Ф., Рысков А.П., Гинцбург А.Л., Прозоровский С.В. Геномная дактилоскопия возбудителей сапронозов // Журн. микробиол. – 1991. – № 6. – С. 25–29.

Shaginyan IA, Ananjina YV, Tokarskaya ON, Tartakovsky IS, Bryukhanov AF, Ryskov AP, Ginzburg AL, Prozorovsky SV (1991). Genomic dactyloscopy of sapronosis agents [Genomnaja daktiloskopija vzbuditelej sapronozov]. *Zhurn. mikrobiol.*, 6, 25-29.

21. Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний людей лептоспирозами: МУ 3.1.1128-02. – М., 2002. – 44 с.

Epidemiology, diagnostics and prevention of leptospiroses diseases in humans: MU 3.1.1128-02: [Jepidemiologija, diagnostika i profilaktika zabolevanij ljudej leptospirozami: MU 3.1.1128-02] (2002), 44.

22. Ahmed A, Anthony RM, Hartskeerl RA (2010). A simple and rapid molecular method for *Leptospira* species identification. *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 955-962.

23. Ahmed N, Devi SM, Valverde MA, Vijayachari P, Machang'u R, Ellis W, Hartskeerl R (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 5 (28), 10.

24. Levett P (2001). Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14 (2), 296-326.

25. Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N (2008). The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends (review). *Int. J. Infect. Dis.*, 12, 351-357.

26. Paster BJ, Phylum XV (2010). Spirochaetes Garrity and Holt 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 4, 471-566.

27. Rettinger A, Krupka I, Grünwald K, Dyachenko V, Fingerle V, Konrad R, Raschel H, Busch U, Sing A, Straubinger R, Huber I (2012). *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*, 12, 185.

28. Turk N, Milas Z, Mojcec V, Ruzic-Sabljić E, Staresina V, Stritof Z, Habus J, Postić D (2009). Molecular analysis of *Leptospira* spp. isolated from humans by restriction fragment length polymorphism, real-time PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 300 (2), 174-179.

29. Vijayachari P, Sugunan A, Shriram A (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J. Biosci.*, 33 (4), 557-569.

30. World Health Organization (2007). Leptospirosis: laboratory manual, 69.

#### Сведения об авторах Information about the authors

**Киселева Евгения Юрьевна** – врач-бактериолог отдела биологического и технологического контроля ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора (664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-43, факс: 8 (3952) 22-01-40; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

**Kiseleva Yevgeniya Yurievna** – Bacteriologist of the Department of Biological and Technological Control of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor (664047, Irkutsk, ul. Trilissera, 78; tel.: +7 (3952) 22-01-43, fax: +7 (3952) 22-01-40; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

**Бренева Наталья Владимировна** – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела эпидемиологии ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора

**Breneva Natalia Vladimirovna** – Candidate of Medical Sciences, Leading Research Officer of the Epidemiology Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor

**Носков Алексей Кимович** – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела эпидемиологии ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора

**Noskov Alexey Kimovich** – Candidate of Medical Sciences, Leading Research Officer of the Epidemiology Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor

**Шаракшанов Мунко Баярович** – врач-эпидемиолог отдела эпидемиологии ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора

**Sharakhshonov Munko Bayarovich** – Epidemiologist of the Epidemiology Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor

**Балахонov Сергей Владимирович** – доктор медицинских наук, профессор, директор ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора

**Balakhonov Sergey Vladimirovich** – Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor

**Гефан Наталья Геннадьевна** – кандидат медицинских наук, заведующая отделом биологического и технологического контроля ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора

**Gefan Natalia Gennadjevna** – Candidate of Medical Sciences, Head of Department of Biological and Technological Control of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor