

DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-81-88

УДК 616.9:614.4(470.63)

Е.В. Чекрыгина¹, А.С. Волынкина², Е.С. Котенев², Я.В. Лисицкая², О.А. Гнусарева², А.Н. Куличенко²**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ ИНФЕКЦИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ**¹ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Ставрополь, Российская Федерация;²ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Цель работы – проведение молекулярно-генетического типирования штаммов и изолятов нуклеиновых кислот возбудителей природно-очаговых инфекций бактериальной и вирусной этиологии, накопление данных о генетических особенностях региональных штаммов, циркулирующих на территории Ставропольского края. **Материалы и методы.** Для изучения генетического спектра возбудителей природно-очаговых инфекций проводили анализ штаммов и изолятов нуклеиновых кислот возбудителей, выявленных в образцах полевого и клинического материала. Индикацию возбудителей природно-очаговых инфекций в образцах осуществляли методом ПЦР. Для генетического типирования штаммов и изолятов ДНК/РНК возбудителей природно-очаговых инфекций использовали методы MLVA-типирования и секвенирования участков генома с последующим филогенетическим анализом. Анализ территориального распространения генетических вариантов возбудителей природно-очаговых инфекций и построение карт выполняли в программном обеспечении ArcGIS 10.1. **Результаты и выводы.** Выполнены: MLVA-25 типирование 20 штаммов *Francisella tularensis*; MLVA-10 типирование 4 изолятов *Coxiella burnetii*; видовая идентификация 20 изолятов ДНК *Rickettsia* sp.; субвидовое типирование 40 РНК-изолятов вируса ККГЛ и 8 РНК-изолятов хантавирусов, циркулировавших на территории Ставропольского края в 2016–2017 гг. Изученные штаммы *F. tularensis* принадлежат к восьми MLVA генотипам, в основном приуроченным к определенным территориям. Изоляты *C. burnetii* обладают идентичным MLVA-типом. Выявлены риккетсии, относящиеся к 5 видам: *R. massiliae*, *R. raoultii*, *R. sibirica*, *R. aeschlimannii*, *R. slovacica*, РНК-изоляты хантавируса генотипа «Тула», варианты вируса ККГЛ генотипов «Европа-1» и «Европа-3». Полученные данные могут быть использованы при эпидемиологическом анализе возможных случаев инфекционных болезней для определения источника и путей распространения инфекции.

Ключевые слова: природно-очаговые инфекции, Ставропольский край, генетическое типирование.

Корреспондирующий автор: Волынкина Анна Сергеевна, e-mail: volyn444@mail.ru.

Для цитирования: Чекрыгина Е.В., Волынкина А.С., Котенев Е.С., Лисицкая Я.В., Гнусарева О.А., Куличенко А.Н. Генетическое профилирование возбудителей природно-очаговых инфекций, циркулирующих на территории Ставропольского края. Проблемы особо опасных инфекций. 2018; 4:81–88. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-81-88

E.V. Chekrygina¹, A.S. Volynkina², E.S. Kotenev², Ya.V. Lisitskaya², O.A. Gnusareva², A.N. Kulichenko²**Genetic Profiling of the Causative Agents of Natural-Focal Infections, Circulating in the Stavropol Territory**¹Stavropol State Medical University of the Ministry of Health of RF Stavropol, Russian Federation; ²Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was genetic typing of the strains and nucleic acid isolates of causative agents of natural focal infections, both bacterial and viral etiology, accumulation of data on genetic features of regional strains circulating in the Stavropol Territory. **Material and methods.** To study the genetic spectrum of causative agents of natural-focal infections, analysis of the strains and nucleic acids isolates detected in the samples of field and clinical material was carried out. Indication of causative agents of natural focal infections in the samples was carried out by PCR. For genetic typing of the strains and DNA/RNA isolates of natural focal infections agents, MLVA and sequencing of genome regions with subsequent phylogenetic analysis were used. The analysis of territorial distribution of the causative agent genetic variants and mapping was performed in ArcGIS 10.1. **Results and conclusions.** MLVA-25 typing of 20 strains of *Francisella. tularensis*, MLVA-10 typing of 4 *Coxiella burnetii* isolates, species identification of 20 isolates of *Rickettsia* sp., sub-species genetic typing of 40 RNA isolates of CCHF virus and 8 RNA isolates of hantaviruses circulating in the Stavropol Territory in 2016–2017 were performed. The studied strains of *F. tularensis* belong to eight MLVA genotypes. They are mainly confined to specific areas. The isolates of *C. burnetii* have the same MLVA type. *Rickettsia*, belonging to 5 species: *R. massiliae*, *R. raoultii*, *R. sibirica*, *R. aeschlimannii*, *R. slovacica*, RNA-isolates of hantavirus of the «Tula» genotype and variants of the CCHF virus of the Europe-1 and Europe-3 genotypes were identified. The obtained data can be used in the epidemiological investigation of possible cases of infectious diseases to determine the source and pathways of infection.

Key words: genetic typing, natural-focal infections, Stavropol Territory.

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

Corresponding author: Anna S. Volynkina, e-mail: volyn444@mail.ru.

Citation: Chekrygina E.V., Volynkina A.S., Kotenev E.S., Lisitskaya Ya.V., Gnusareva O.A., Kulichenko A.N. Genetic Profiling of the Causative Agents of Natural-Focal Infections, Circulating in the Stavropol Territory. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2018; 4:81–88. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-81-88

Received 02.08.18. Revised 29.08.18. Accepted 05.10.18.

Ставропольский край (СК) – крупнейший рекреационный регион Российской Федерации. Близость к Ближнему Востоку и активные связи со странами этого региона обуславливают необходимость постоянной настороженности в плане заноса возбудителей опасных инфекций. В то же время, СК является эндемичным регионом по ряду природно-очаговых инфекций (ПОИ) бактериальной и вирусной этиологии. На территории СК установлена циркуляция *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Borrelia burgdorferii* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* sp., вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), хантавирусов. В СК ежегодно регистрируется заболеваемость ПОИ, наибольшую актуальность из которых представляют туляремия, Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) и иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ). В 2016 г. зарегистрирован 41 случай заболевания лихорадкой Ку [1, 2].

Для проведения эффективного эпидемиологического мониторинга возбудителей ПОИ, прогнозирования возможных осложнений эпидемиологической обстановки и повышения эффективности профилактических и противоэпидемических мероприятий важна информация о биологических свойствах штаммов возбудителей и особенностях их территориального распространения.

Широкое практическое применение для идентификации микроорганизмов получили методы молекулярно-генетического анализа. Для большинства возбудителей инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы разработаны технологии генетического типирования, обладающие различной дискриминирующей способностью и алгоритмами интерпретации результатов: ПЦР-типирование (PCR-RFLP, MLVA), сиквенс-типирование (MLST, секвенирование фрагментов генов), полногеномное секвенирование. Использование методов генетической идентификации возбудителей для эпидемиологического анализа ограничено рядом условий, в т.ч. наличием в открытом доступе баз данных, содержащих, наряду со сведениями о мировом генетическом разнообразии возбудителей, информацию о генетических особенностях штаммов, циркулирующих в отдельных регионах. Создание баз данных, содержащих сведения о генетических особенностях, биологических свойствах, месте и времени выделения региональных штаммов является основой для осуществления молекулярно-эпидемиологического мониторинга возбудителей инфекционных болезней, в т.ч. для анализа ситуации в режиме «реального времени» при возникновении вспышки инфекционного заболевания.

Проведение генетического мониторинга популяций возбудителей на территории СК актуально, в первую очередь, для патогенов, способных вызывать тяжелые формы заболеваний и приводить к массовым вспышкам инфекционных болезней, к которым относятся возбудители особо опасных и природно-очаговых инфекций.

Цель работы – проведение субвидового генетического типирования штаммов и изолятов нуклеиновых кислот (НК) возбудителей ПОИ бактериальной и вирусной этиологии, накопление данных о генетических особенностях региональных штаммов, циркулирующих на территории СК.

Материалы и методы

Для изучения генетического спектра возбудителей ПОИ бактериальной и вирусной этиологии, циркулировавших на территории СК в 2016–2017 гг., проводили молекулярно-генетический анализ штаммов и анализ изолятов НК возбудителей, выявленных в образцах полевого и клинического материала.

Штаммы микроорганизмов. В работе использовано 20 штаммов *F. tularensis holarctica* биовар II, *ery*, выделенных из проб воды (14 штаммов), от грызунов (5 штаммов) и пробы сена (1 штамм), собранных на территории СК в феврале–апреле 2017 г.

Клинический материал. Исследовано 186 проб клинического материала (плазма крови) от лихорадящих больных в СК в 2016 г., полученных из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае».

Полевой материал. Исследовано 824 пула (10241 экзemplя) иксодовых клещей, относящихся к видам: *Boophilus annulatus* – 6 (36), *Dermacentor marginatus* – 72 (498), *D. reticulatus* – 64 (474), *D. niveus* – 17 (59), *Haemaphysalis punctata* – 34 (190), *H. inermis* – 6 (93), *Hyalomma marginatum* – 293 (6020), *H. scupence* – 80 (697), *Ixodes ricinus* – 49 (399), *I. redikorzevi* – 13 (93), *Rhipicephalus rossicus* – 33 (314), *R. sanguineus* – 12 (55), *R. bursa* – 1 (3), *R. turanicus* – 144 (1310), а также 418 проб легкого грызунов и мелких млекопитающих, относящихся к видам: *Crocidura leucodon* (16), *Crocidura suaveolens* (18), *Sorex volnuchini* (2), *Sorex satunini* (8), *Mus musculus* (76), *Apodemus fulvipectus* (16), *Apodemus uralensis* (194), *Apodemus fulvipectus* (5), *Apodemus agrarius* (11), *Arvicola amphibius* (1), *Microtus socialis* (11), *Microtus arvalis* (49), *Cricetulus migratorius* (8), *Cricetus cricetus* (2), *Mesocricetus raddei* (1). Пробы полевого материала собраны в апреле–сентябре 2016 г. при проведении эпизоотологического обследования территории 15 административных районов СК.

Индикация НК возбудителей ПОИ. Пулы иксодовых клещей и пробы крови от лихорадящих больных исследовали методом ПЦР на наличие РНК вируса ККГЛ, ДНК *C. burnetii* и риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок, с использованием наборов реагентов «АмплиСенс® ССНФV-FL», «АмплиСенс® Риккетсии группы КПЛ-FL», «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, Россия). Пробы легкого грызунов и мелких млекопитающих исследовали методом ПЦР на наличие РНК хантавирусов в соответствии с ранее описанной методикой [3]. Экстракцию РНК/ДНК из

образцов клинического и полевого материала производили с помощью наборов реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, Россия), получение комплементарной ДНК – с помощью набора реагентов «РЕВЕРТА-L-100» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, Россия).

Генетическое типирование штаммов/изолятов НК возбудителей ПОИ. MLVA-типирование *F. tularensis* проводили на основании анализа 25 локусов, по методу, предложенному Johansson, 2004 г. [4].

Генетическое типирование штаммов *S. burnetii* выполняли методом MLVA на основании анализа 10 минисателлитных локусов [5]. Точный размер амплифицированных VNTR локусов определяли с использованием метода капиллярного секвенирования.

Идентификацию изолятов *Rickettsia* sp. проводили на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов 4 генов (*atpA*, *dnaK*, *gltA*, *ompB*) [4].

Генетическую идентификацию вируса ККГЛ выполняли на основании анализа нуклеотидной последовательности трех участков генома вируса: фрагментов кодирующей области S, M и L сегментов размером 537 п.н., 435 п.н. и 437 п.н. соответственно [6].

Для генотипирования РНК-изолятов хантавирусов использовали метод прямого секвенирования фрагмента L-сегмента генома вируса размером 347 п.н. с последующим филогенетическим анализом [3].

Секвенирование нуклеотидных последовательностей ПЦР фрагментов генома вирусов, риккетсий, а также VNTR локусов проводили на генетическом анализаторе «ABI 3130 Genetic Analyser» (Applied Biosystems, США) с набором реагентов «Big Dye Terminator Kit v.3.1».

Биоинформационный анализ результатов MLVA типирования *F. tularensis* и *S. burnetii* выполняли в программе Start 2, для сравнения использовали MLVA-профили, полученные из международной базы данных MLVAbank [7].

Построение филогенетических деревьев на основе нуклеотидных последовательностей фрагментов генома вируса ККГЛ и хантавирусов осуществляли в программе Mega 5.05. с применением метода Neighbor joining по алгоритму Kimura-2.

Анализ территориального распространения генетических вариантов. Привязка координат точек сбора полевого материала и предполагаемых мест заражения больных, к топографической карте Ставропольского края и построение карт выполнено с помощью программного обеспечения ArcGIS 10.1.

Результаты и обсуждение

Индикация возбудителей ПОИ в полевом и клиническом материале. При исследовании методом ПЦР 824 пулов иксодовых клещей, собранных в 2016 г. на территории СК края, в 18 пробах обнаружена РНК вируса ККГЛ, в 123 пробах – ДНК *S. burnetii*, в 245 пробах – ДНК *Rickettsia* sp. Положительные

на наличие РНК вируса ККГЛ клещи относились к видам: *H. marginatum* (15 пулов), *H. scupence* (1) и *R. turanicus* (2). Возбудитель лихорадки Ку выявлен в 10 видах иксодовых клещей: *H. marginatum* (55), *R. turanicus* (43), *D. marginatus* (8), *H. scupence* (4), *B. annulatus* (2), *H. punctata* (3), *I. ricinus* (3), *D. niveus* (2), *D. reticulatus* (1), *R. bursa* (1). Риккетсии группы КПЛ обнаружены в 11 видах клещей: *H. marginatum* (85), *R. turanicus* (84), *H. scupence* (22), *I. ricinus* (14), *D. marginatus* (13), *D. reticulatus* (7), *H. punctata* (5), *D. niveus* (4), *B. annulatus* (3), *R. rossicus* (2) и *R. sanguineus* (1). Иксодовые клещи, инфицированные вирусом ККГЛ, обнаружены на территории 4 административных районов Ставропольского края: Апанасенковского – 10,5 % положительных проб, Левокумского – 6,5 %, Нефтекумского – 2,6 % и Курского – 2,2 %. *S. burnetii* циркулирует на территории 8 административных районов СК, наиболее высокий уровень зараженности клещей выявлен в Левокумском (58,3 %), Нефтекумском (16,3 %) и Курском (15,1 %) районах. Риккетсии группы КПЛ встречаются на территории 10 районов края, наибольшее количество положительных проб выявлено в Нефтекумском (58,8 %), Шпаковском (44,4 %) и Курском (44,3 %) районах.

В результате ПЦР-анализа 418 проб суспензий легкого грызунов и мелких млекопитающих, РНК хантавирусов выявлена в 8 пробах. Инфицированные хантавирусом грызуны относились к трем видам: *Microtus arvalis* (6), *Apodemus agrarius* (1) и *Arvicola amphibius* (1). Циркуляция хантавирусов установлена на территории Шпаковского (уровень инфицированности грызунов – 4,7 %), Труновского (2,8 %) и Красногвардейского (2,2 %) районов Ставропольского края.

Методом ПЦР на наличие РНК вируса ККГЛ, ДНК *S. burnetii* и риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок исследовано 186 проб клинического материала (плазмы крови) от лихорадящих больных в СК в 2016 г., полученных из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае». В результате исследования в 50 пробах выявлена ДНК возбудителя лихорадки Ку, в 62 пробах – РНК вируса ККГЛ. ДНК *S. burnetii* детектирована в материале от больных из 16 административных районов края (наибольшее количество больных выявлено в Нефтекумском (20) и Советском (6) районах), РНК вируса ККГЛ обнаружена в образцах от больных из 18 районов, наибольшее количество – в Апанасенковском (1), Петровском (7), Красногвардейском (6), Нефтекумском (6) и Труновском (6) районах.

Положительные на наличие НК возбудителей ПОИ пробы полевого и клинического материала, использовались для проведения субвидового типирования патогенов.

Генетическое типирование возбудителей ПОИ.

Francisella tularensis. Выполнено MLVA-25 типирование 20 штаммов *F. tularensis*, выделенных в

феврале–апреле 2017 г. из источников водоснабжения в с. Донская Балка (культуры № 1, 7, 17, 21, 23, 26, 137, 154) и с. Константиновское (№ 88, 114, 115, 121, 126, 130) Петровского района, от грызунов, отловленных в с. Донская Балка (№ 58) и с. Николина Балка (№ 6, 63) Петровского района, с. Золотаревка (№ 25) Ипатовского района и с. Надежда (№ 145) Шпаковского района, пробы сена, отобранной в с. Шведино Петровского района.

Исследуемые штаммы относились к 8 MLVA-генотипам, отличающимся по числу tandemных повторов в локусах FT-M3 (11, 12, 17, 20 повторов), FT-M6 (4, 5 повторов), FT-M10 (2, 11 повторов), FT-M20 (3, 4 повтора) и FT-M24 (1, 2 повтора). У всех исследованных штаммов было идентичное число повторов в локусах FT-M1 (3 повтора), FT-M2 (2), FT-M4 (4), FT-M5 (2), FT-M7 (2), FT-M8 (2), FT-M9 (2), FT-M11 (5), FT-M12 (2), FT-M13 (1), FT-M14 (3), FT-M15 (3), FT-M16 (1), FT-M17 (2), FT-M18 (2), FT-M19 (1), FT-M21 (2), FT-M22 (4), FT-M23 (1), FT-M25 (4). На филогенетическом дереве, построенном на основе результатов генотипирования исследуемых штаммов и данных из международной базы MLVAbank, штаммы *F. tularensis*, выделенные на территории СК, принадлежали к генетическим группам В.І, В.ІІІ и В.ІІІІ (рис. 1).

Штаммы кластера В.І отличаются наличием 5 повторов в локусе FT-M6 и 3 повторов в локусе FT-M20, кластера В.ІІІ – 4 повторов в локусе FT-M6 и 3 повторов в локусе FT-M20, кластера В.ІІІІ – 4 повторов в локусах FT-M6 и FT-M20. В состав кластера В.І, кроме штаммов из Ставропольского края, также входят штаммы, изолированные в Ростовской области (1983, 1985, 1988 гг.), Чехии (1995), Украине (1990), Словакии (1988), странах Скандинавского полуострова (1984, 1984–1985, 1996). К группе В.ІІІ относятся штаммы из Московской области (1949), Республики Крым (1980, 1990), Ростовской области (1988), Республики Калмыкия (1991), Чехии (1995), Швеции (2000), Финляндии (1997). В проведенных ранее исследованиях на территории Ставропольского края выявлены штаммы *F. tularensis*, образующие на филогенетическом дереве в пределах группы штаммов биовара *holarctica* отдельный «Ставропольский» кластер, для штаммов которого характерно наличие двух повторов в локусе FT-M17, различия в пределах кластера выявлены в локусе FT-M3 (выявлено 11, 12, 14 и 15 повторов) [8].

Rickettsia sp. На основании анализа нуклеотидной последовательности 4 генов (*atpA*, *dnaK*, *gltA*, *ompB*) проведена видовая идентификация 20 изолятов ДНК *Rickettsia* sp. выявленных в пулах иксодовых клещей. Сравнение секвенированных последовательностей с данными из базы GenBank с использованием алгоритма BLAST показало их идентичность ДНК риккетсий, относящихся к 5 видам: *R. massiliae* (11 образцов), *R. raoultii* (4), *R. sibirica* (2), *R. aeschlimannii* (2), *R. slovaca* (1) [9]. Идентифицированные виды риккетсий относятся к группе клещевых пятнистых

лихорадок, включающей возбудители, патогенные для человека. Наибольшее медицинское значение среди выявленных видов риккетсий имеет *R. sibirica* – возбудитель североазиатского клещевого риккетсиоза.

Coxiella burnettii. Проведено MLVA-10 типирование четырех изолятов *C. burnettii*, выявленных в 2016 г. в образцах плазмы крови больных лихорадкой Ку из Советского, Благодарненского и Нефтекумского районов СК. Все исследуемые изоляты обладали идентичным VNTR-профилем 4-6-6-4-7-6-3-12-3-11. Сравнение с MLVA генотипами штаммов *C. burnettii* из международной базы данных MLVAbank позволило установить, что исследуемые образцы обладают наибольшим генетическим родством со штаммом R1140, изолированным в России, отличаясь от него по 3 локусам: ms30, ms31 и ms36. Необходимо отметить, что в открытом доступе практически отсутствует информация о генетических особенностях штаммов *C. burnettii*, выделенных на территории РФ.

Вирус ККГЛ. Выполнено генетическое типирование 40 РНК-изолятов вируса ККГЛ из образцов плазмы крови больных КГЛ и суспензий клещей видов *H. marginatum* и *R. turanicus* с достаточной вирусной нагрузкой. Определена нуклеотидная последовательность фрагментов S, M и L сегментов генома вируса размером 538 п.н., 435 п.н. и 437 п.н. Секвенированные нуклеотидные последовательности и референсные геномные последовательности штаммов вируса ККГЛ, принадлежащих к разным генотипам и субтипам вируса, полученные из базы данных GenBank, использовались для проведения филогенетического анализа.

На филогенетических деревьях, построенных по фрагментам S, M и L сегментов генома вируса ККГЛ исследуемые изоляты кластеризовались со штаммами двух генотипов: «Европа-1 (V)» – 39 РНК-изолятов из полевого и клинического материала и «Европа-3 (VII)» – РНК-изолят (130-STV/HU-2016), выявленный в сыворотке крови больного КГЛ, зарегистрированного в с. Безопасное Труновского района (рис. 2 А).

Филогенетический анализ последовательностей фрагментов S и L сегментов, показал, что все исследуемые образцы, в пределах генотипа «Европа-1 (V)», относились к подгруппе Va (типовой штамм STV/HU29223), на филогенетическом дереве по фрагменту M сегмента – к двум генетическим подгруппам: Va и Vb (типовой штамм ROS/HUVLV-100). В результате сравнения кластеровой позиции исследуемых изолятов на филогенетических деревьях по участкам трех сегментов генома, установлена их принадлежность к двум генетическим вариантам: Va-Va-Va (26 РНК-изолятов из клинического материала, 5 – из суспензий иксодовых клещей) и реассортантному варианту Va-Vb-Va (5 РНК-изолятов из плазмы крови больных, 3 – из суспензий клещей). Выявленные генетические

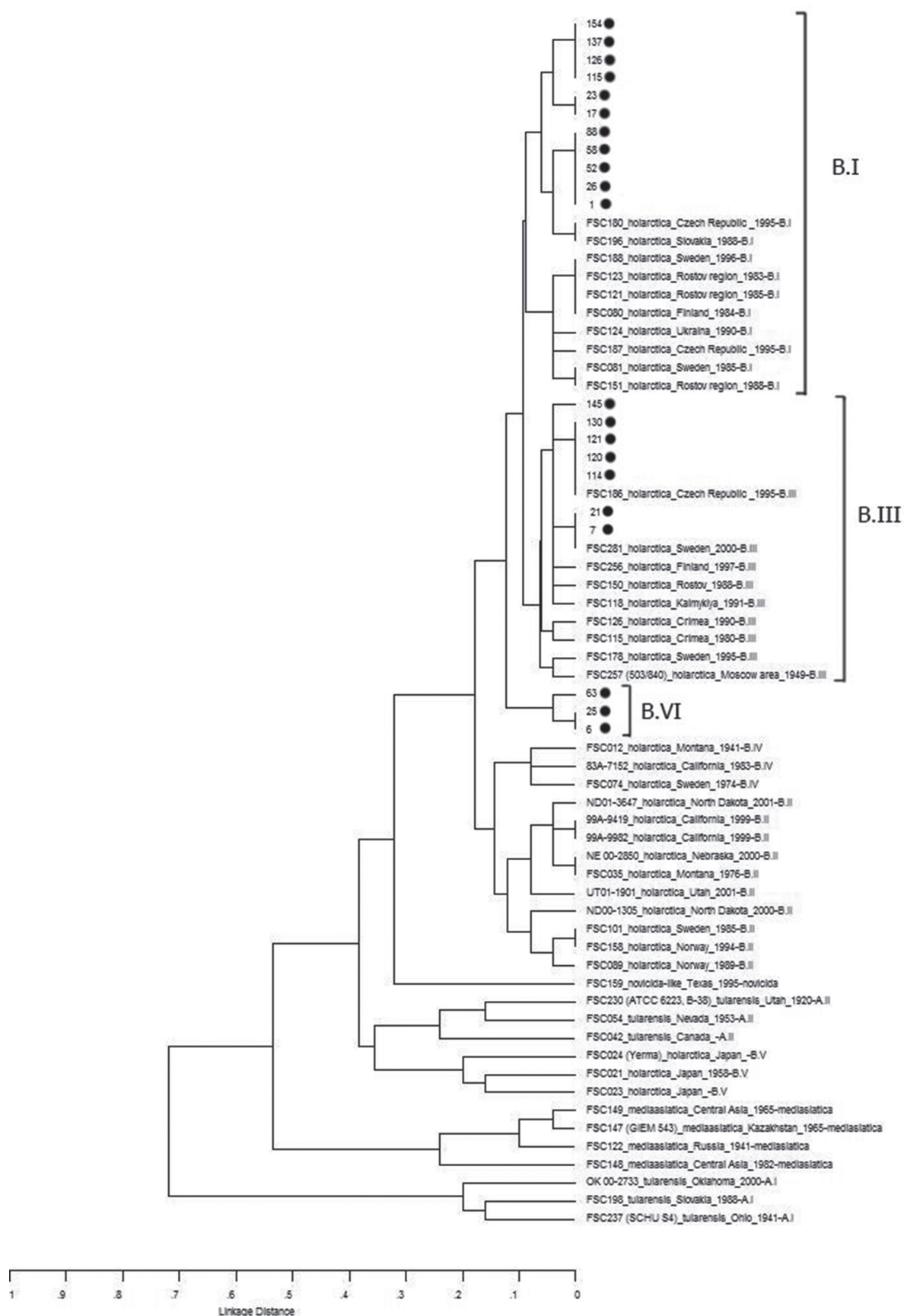


Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основе результатов MLVA-25 типирования штаммов *F. tularensis*. Маркерами отмечены штаммы, исследованные в рамках данной работы

Fig. 1. Tree diagram based on the results of MLVA-25 typing of *F. tularensis* strains. Marked are the strains investigated within the frames of the current study

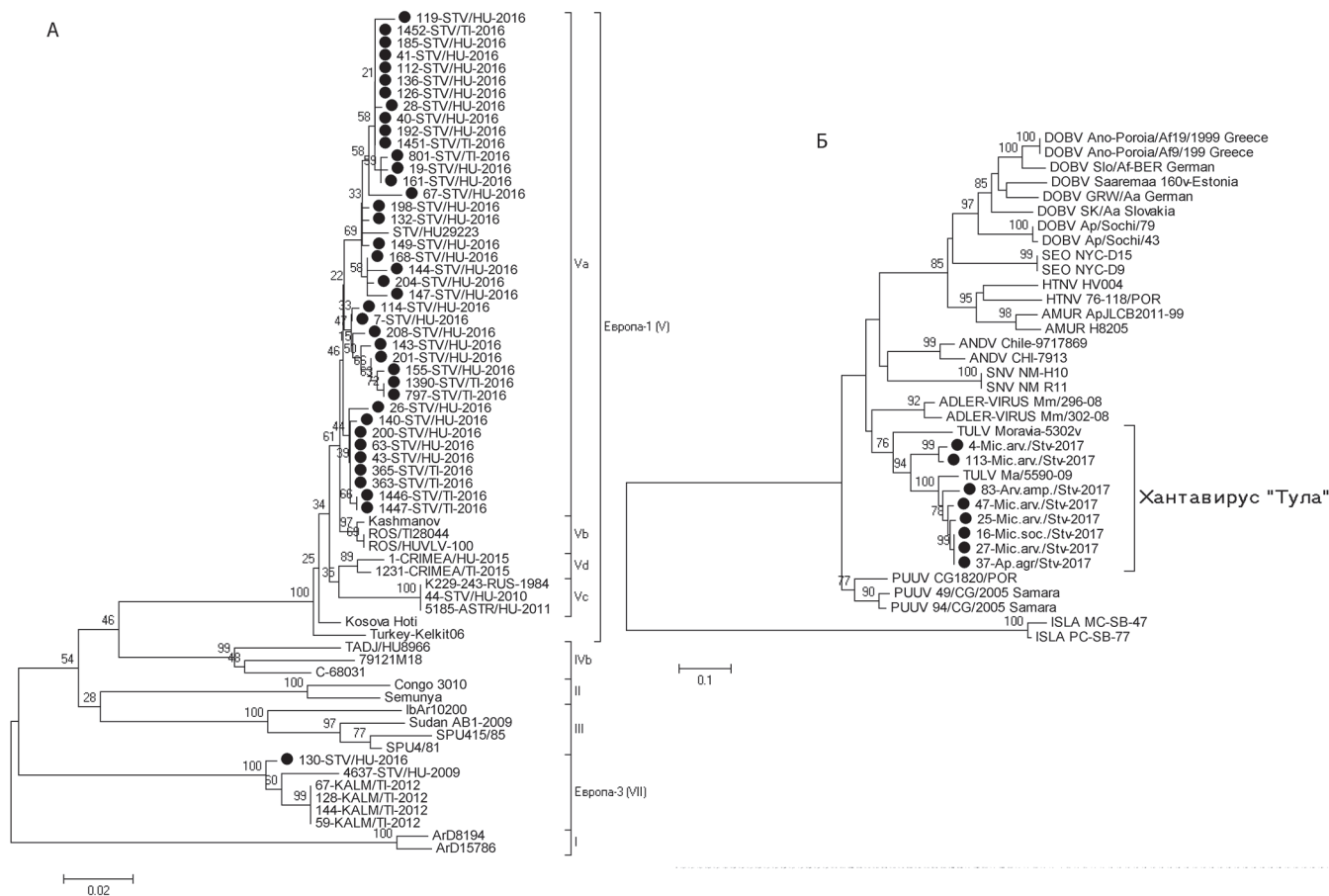


Рис. 2. **А.** Филогенетическое дерево, построенное по фрагменту S сегмента генома вируса ККГЛ (537 п.о). **Б.** Филогенетическое дерево, построенное по фрагменту L сегмента генома хантавирусов (347 п.о). Маркерами отмечены изоляты, исследованные в рамках данной работы

Fig. 2. **A.** Phylogenetic tree drawn by the S fragment of CCHF virus genome (537 bp). **B.** Phylogenetic tree drawn by the L fragment of hantavirus genome segment (347 bp). Marked are the isolates investigated within the frames of the current study

варианты вируса ККГЛ характерны для территории СК. Штаммы генотипа «Европа-1 (V)» преобладают на территории РФ, 99,9 % случаев заболевания КГЛ в России вызвано вирусом ККГЛ этого генотипа. РНК-изоляты вируса ККГЛ генотипа «Европа-3» ранее выявлены в сыворотке крови больного КГЛ из Ставропольского края в 2009 г. (хут. Нижне-Колонский Андроповского р-на) и образцах суспензий клещей *H. marginatum*, собранных в Республике Калмыкия в 2012 г.

Хантавирус. Выполнена генетическая идентификация РНК-изолятов хантавирусов, выявленных в 8 образцах суспензий легкого грызунов: № 16 – *M. socialis* (Шпаковский р-н, пос. Приозерный, 2016 г.); № 25, 27, 47 – *M. arvalis* (Шпаковский р-н, пос. Приозерный, 2016 г.); № 37 – *A. agrarius* (Шпаковский р-н, пос. Приозерный, 2016 г.); № 4 – *M. arvalis* (Труновский р-н, с. Безопасное, 2016 г.); № 83 – *Arvicola amphibius* (Красногвардейский р-н, пос. Пролетарский, 2016 г.); № 113 – *M. arvalis* (Красногвардейский р-н, хут. Медвеженский, 2016 г.). Определена нуклеотидная последовательность фрагмента L сегмента генома вируса размером 347 п.о. При филогенетическом анализе секвенированных

последовательностей генома вируса установлено, что в исследуемых образцах содержится хантавирус «Тула» (рис. 2 Б). Различия нуклеотидной последовательности фрагмента L сегмента исследуемых РНК-изолятов составили 1,8–14,7 %, отличия исследуемых изолятов от других штаммов генотипа «Тула» – 6,1–20,5 %. Таким образом, нами получено доказательство циркуляции хантавируса Тула на территории Ставропольского края. Хантавирус «Тула» впервые выявлен от *M. arvalis* и *M. rossiaemeridionalis*, отловленных в Тульской области РФ в 1994 г., также данный вид хантавируса обнаружен на территории Омской области, Республики Крым, Восточного Казахстана, стран Центральной и Восточной Европы [10]. Переносчиками вируса Тула являются различные виды полевок (род *Microtus*). Хантавирус «Тула» обладает низким патогенным потенциалом для человека.

Территориальная приуроченность генетических вариантов возбудителей ПОИ на территории СК представлена на рис. 3.

В результате проведенной работы впервые осуществлено комплексное молекулярно-генетическое профилирование возбудителей ПОИ на территории

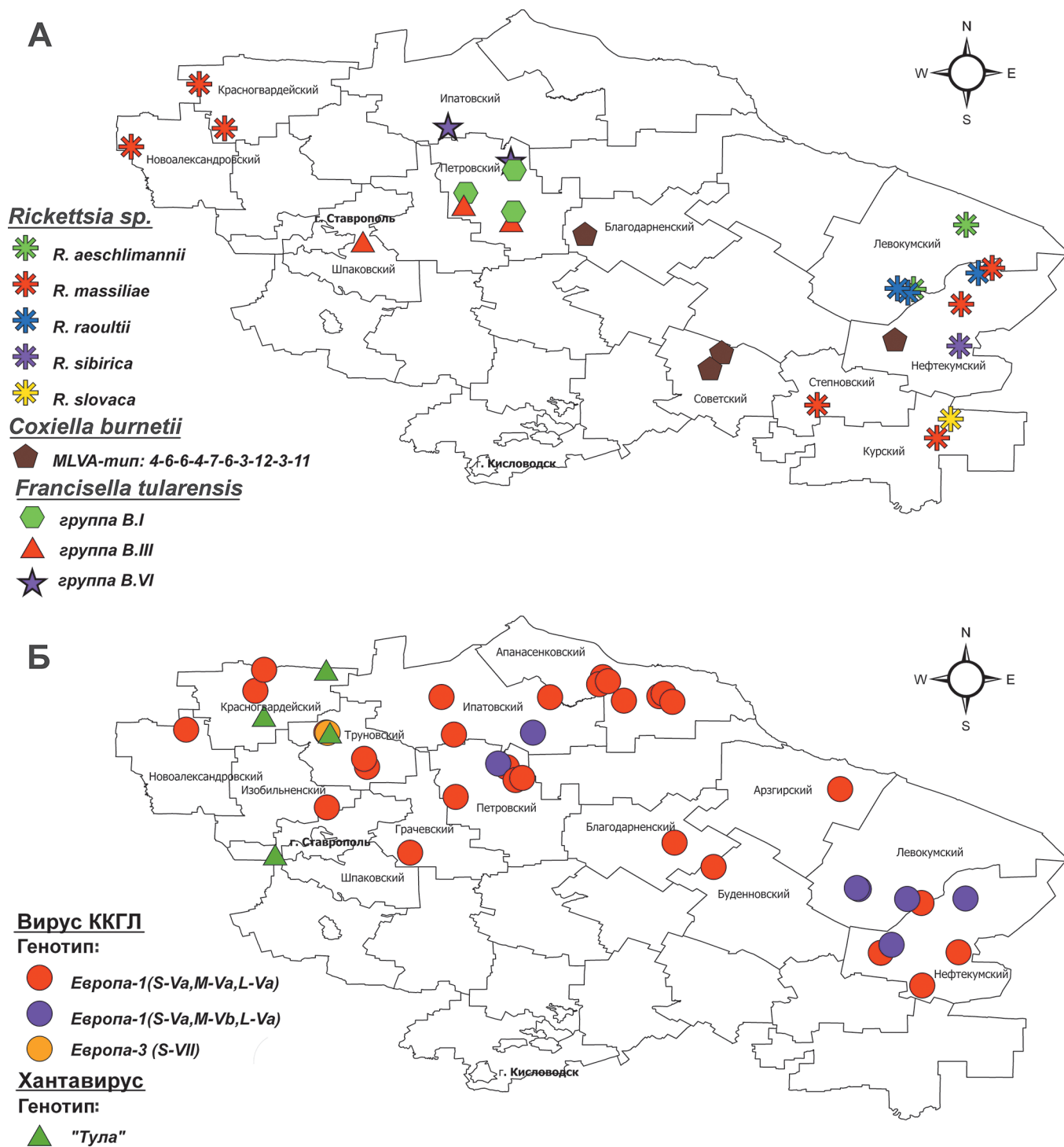


Рис. 3. Места выделения изолятов возбудителей природно-очаговых инфекций, циркулировавших на территории Ставропольского края в 2016–2017 гг.

Fig. 3. Sites of isolation of natural-focal infections agents that circulated in the Stavropol Territory in 2016–2017

отдельного региона – Ставропольского края. На основании генетической идентификации изолятов определены особенности региональных популяций возбудителей ПОИ. Получены новые данные о генетической гетерогенности штаммов *F. tularensis* и *C. burnetii*, циркулирующих на территории СК. Впервые доказана инфицированность грызунов в СК хантавирусом «Тула», получены сведения о ви-

довом разнообразии изолятов риккетсий группы КПЛ. Проведена оценка эпидемического потенциала возбудителей ПОИ на территории СК: низким патогенным потенциалом для человека обладают хантавирус генотипа «Тула», выявленные виды риккетсий группы КПЛ, наибольшей эпидемической значимостью обладают выявленные варианты вируса ККГЛ, *F. tularensis*, *C. burnetii*.

Продолжение начатых исследований позволит уточнить особенности фоновых генетических вариантов возбудителей ПОИ на этой территории, оценить динамику и направленность вероятных изменений. Полученные данные будут использованы при эпидемиологическом анализе возможных случаев (вспышек) инфекционных болезней для определения источника и путей распространения инфекции.

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

Список литературы

- Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Григорьев М.П. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном, Северо-Кавказском и Крымском федеральных округах в 2015 г.: аналитический обзор. Ставрополь: Литера; 2016. 95 с.
- Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Григорьев М.П., составители. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральном округах в 2016 г. Аналитический обзор. Ставрополь: Литера; 2017. 164 с.
- Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Denys C., Koivogui L., ter Meulen J., Krüger D.H. Hantavirus in African Wood Mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5):838–40. DOI:10.3201/eid1205.051487.
- Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Byström M., Fox J., Chu M., Forsman M., Sjöstedt A., Keim P. Worldwide Genetic Relationships among *Francisella tularensis* Isolates Determined by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *J. Bacteriol.* 2004; 186(17):5808–18. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004.
- Arricau-Bouvery N., Hauck Y., Bejaoui A., Frangoulidis D., Bodier C.C., Souriau A., Meyer H., Neubauer H., Rodolakis A., Vergnaud G. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiology.* 2006; 6:38. DOI: 10.1186/1471-2180-6-38.
- Куличенко А.Н., Волынкина А.С., Котенев Е.С., Писаренко С.В., Шапошников Л.И., Лисицкая Я.В., Василенко Н.Ф., Цыганкова О.И., Евченко Ю.М., Тохов Ю.М., Савельев В.Н., Тихонов С.Н., Пеньковская Н.А. Новый генетический вариант вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, выявленный в Крыму. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2016; 34(2):76–80. DOI: 10.18821/0208-0613-2016-34-2-76-80.
- MLVAbank for Microbes Genotyping [Электронный ресурс]. URL: <http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/524/2?panel=911> (дата обращения 15.06.2018 г.).
- Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н., Павлов В.М., Дятлов И.А. Молекулярное типирование штаммов *Francisella tularensis* методом мультилокусного анализа вариабельности числа тандемных повторов. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2014; 1:8–15.
- Torina A., Fernández de Mera I.G., Alongi A., Mangold A.J., Blanda V., Scarlata F., Di Marco V., de la Fuente J. *Rickettsia conorii* Indian Tick Typhus Strain and *R. slovaca* in Humans, Sicily. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(6):1008–10. DOI:10.3201/eid1806.110966.
- Яшина Л.Н., Зайковская А.В., Протопопова Е.В., Бабкин И.В., Малышев Б.С., Товпинцев Н.Н., Евстафьев И.Л. Хантавирус Тула на территории Крыма. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2015; 33(4):38–40.

References

- Kulichenko A.N., Maletskaia O.V., Vasilenko N.F., Manin E.A., Prislegina D.A., Dubiansky V.M., Grigor'ev M.P. [Epidemiological situation on natural-focal infectious diseases in Southern, North-Caucasian and Crimean Federal Districts in 2015: analytical review]. Stavropol: "Litera"; 2016. 95 p.
- Kulichenko A.N., Maletskaia O.V., Vasilenko N.F., Manin E.A., Prislegina D.A., Dubiansky V.M., Grigor'ev M.P., contributors. [Epidemiological situation on natural-focal infectious diseases in Southern, North-Caucasian and Crimean Federal Districts in 2016: analytical review]. Stavropol: "Litera"; 2017. 164 p.
- Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Denys C., Koivogui L., ter Meulen J., Krüger D.H. Hantavirus in African Wood Mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5):838–40. DOI:10.3201/eid1205.051487.
- Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Byström M., Fox J., Chu M., Forsman M., Sjöstedt A., Keim P. Worldwide Genetic Relationships among *Francisella tularensis* Isolates Determined by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *J. Bacteriol.* 2004; 186(17):5808–18. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004.
- Arricau-Bouvery N., Hauck Y., Bejaoui A., Frangoulidis D., Bodier C.C., Souriau A., Meyer H., Neubauer H., Rodolakis A., Vergnaud G. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiology.* 2006; 6:38. DOI: 10.1186/1471-2180-6-38.
- Kulichenko A.N., Volynkina A.S., Kotenev E.S., Pisarenko S.V., Shaposhnikova L.I., Lisitskaya Ya.V., Vasilenko N.F., Tsygankova O.I., Evchenko Yu.M., Tokhov Yu.M., Savel'ev V.N., Tikhonov S.N., Pen'kovskaya N.A. [New genetic variant of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus detected in Crimea]. *Молекулярная генетика, микробиология, и вирусология.* 2016; 34(2):76–80. DOI: 10.18821/0208-0613-2016-34-2-76-80.
- MLVAbank for Microbes Genotyping [Internet] (cited 15 Jun 2018). Available from: <http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/524/2?panel=911>.
- Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н., Павлов В.М., Дятлов И.А. [Молекулярное типирование *Francisella tularensis* штаммов с помощью мультилокусного VNTR анализа]. *Молекулярная генетика, микробиология, и вирусология.* 2014; 1: 8–15.
- Torina A., Fernández de Mera I.G., Alongi A., Mangold A.J., Blanda V., Scarlata F., Di Marco V., de la Fuente J. *Rickettsia conorii* Indian Tick Typhus Strain and *R. slovaca* in Humans, Sicily. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(6):1008–10. DOI:10.3201/eid1806.110966.
- Yashina L.N., Zaikovskaya A.V., Protopyopova E.V., Babkin I.V., Malyshev B.S., Tovpinets N.N., Evstaf'ev I.L. [Hantavirus of the «Tula» genotype in the territory of Crimea]. *Молекулярная генетика, микробиология, и вирусология.* 2015; 33 (4): 38–40.

Authors:

Chekrygina E.V. Stavropol State Medical University. Stavropol, Russian Federation.
Volynkina A.S., Kotenev E.S., Lisitskaya Ya.V., Gnusareva O.A., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Об авторах:

Чекрыгина Е.В. Ставропольский государственный медицинский университет. Российская Федерация, 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310. E-mail: Chekrygina-e@mail.ru.
Волынкина А.С., Котенев Е.С., Лисицкая Я.В., Гнусарева О.А., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Поступила 02.08.18.

Отправлена на доработку 29.08.18.

Принята к публ. 05.10.18.