

4. Статистический бюллетень. Итоги всероссийской переписи населения 2010 года по Иркутской области. Иркутск: Иркутскстат, 2012.
5. Baatarxuu O., Kim D.Y., Bat-Ireedui P., Han K.H. Current situation of hepatocellular carcinoma in Mongolia. *Oncology*. 2011, 81 Suppl 1: 148-151.
6. Babor T., Higgins-Biddle J.C., Saunders J.B., Monteiro M.G. AUDIT — The Alcohol Use Disorders Identification Test: Guidelines for Use in Primary Health Care (2nd edn). Geneva: World Health Organization, 2001.
7. But D.Y., Lai C.L., Yuen M.F. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2008, 14(11): 1652-1656.
8. Cole P., Morrison A.S. Basic issues in population screening for cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1980, 64(5): 1263-1272.
9. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2018; 69(1): 182-236.
10. Global hepatitis report 2017. Geneva: World Health Organization, 2017.
11. Parikh N.D., Fu S., Rao H. et al. Risk assessment of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C in China and the USA. *Dig. Dis. Sci.* 2017, 62(11): 3243-3253.
12. Raza S.A., Clifford G.M., Franceschi S. Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *British J. Cancer.* 2007, 96(7): 1127-1134.
13. Trad D., Bibani N., Sabbah M. et al. Known new and emerging risk factors of hepatocellular carcinoma (review). *Presse Med.* 2017, 46(11): 1000-1007.
14. Tsatsralt-Od B., Takahashi M., Nishizawa T. et al. Inoue J., Ulaankhuu D., Okamoto H. High prevalence of hepatitis B, C and delta virus infections among blood donors in Mongolia. *Arch. Virol.* 2005, 150(12): 2513-2528.
15. Yapali S., Tosun N. Epidemiology and viral risk factors for hepatocellular carcinoma in the Eastern Mediterranean countries. *Hepatoma Res.* 2018, 4: 24-34.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Н.А.Михайлова, А.А.Калошин, Е.М.Зими́на, А.В.Солдатенкова, А.В.Поддубиков*

## **ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ СИНЕГНОЙНОЙ**

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

*Цель.* Оценка эффективности и безопасности трех экспериментальных серий рекомбинантной вакцины синегнойной. *Материалы и методы.* Препарат получен на основе рекомбинантных белков OprF и анатоксина, хроматографически очищенных на никель-сефарозе. В качестве адьюванта использовали гидроокись алюминия. Подлинность компонентов подтверждена с помощью электрофореза и иммуноблоттинга. Определение концентрации эндотоксинов в вакцине проводили в количественном хромогенном ЛАЛ-тесте. Аномальную токсичность, анафилактическую активность, реакцию гиперчувствительности замедленного типа проводили в соответствии с руководством по доклиническим исследованиям под редакцией А.Н. Миронова. Оценку иммуногенной активности проводили в опытах при двукратной иммунизации мышей с последующим заражением вирулентной культурой синегнойной палочки (штамм РА-103). *Результаты.* В результате изучения показателей качества трех серий рекомбинантной вакцины синегнойной подтверждены ее подлинность, стерильность, апиrogenность и нетоксичность. В опытах на животных вакцина не обладала аллергезирующими свойствами, показано, что она защищала мышей от синегнойной инфекции с индексами эффективности 3,0 и более. *Заключение.* Показана эффективность, безопасность и стандартность получения трех экспериментальных серий рекомбинантной вакцины, предназначенной для профилактики инфекций, вызываемых синегнойной палочкой.

Журн. микробиол, 2018, № 6, С. 31—37

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, белок F наружной мембраны (OprF), анатоксин, рекомбинантная вакцина синегнойная

## PRECLINICAL STUDIES OF RECOMBINANT PSEUDOMONAS VACCINE

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

*Aim.* Evaluation of the efficacy and safety of the three experimental lots of Recombinant Pseudomonas Vaccine. *Materials and methods.* The preparation contained the recombinant proteins OprF and toxoid that were purified by chromatography in nickel-sepharose. Aluminum hydroxide was used as an adjuvant. The authenticity of the vaccine components was confirmed by electrophoresis and immunoblotting. The concentration of endotoxin in the vaccine was determined by LAL test. The abnormal toxicity was evaluated in mice and cavy. The anaphylactic activity was evaluated in cavy. The delayed-type hypersensitivity reaction was evaluated in mice. Evaluation of the immunogenicity was carried out in an experiment with on double immunization of mice with following intraperitoneally infection by a live virulent culture of *P. aeruginosa* (PA-103 strain). *Results.* The authenticity of the vaccine, sterility, non-pyrogenicity and non-toxicity were confirmed after the studying of the quality indicators of the three lots of Recombinant Pseudomonas Vaccine. In animal experiments, the vaccine did not possess allergic properties and it was shown that it protected mice against Pseudomonas infection with Index of efficiency 3.0 and more. *Conclusion.* The efficacy, the safety, and the standardization of three experimental lots of the recombinant vaccine, which is intended to prevent infections caused by *P. aeruginosa*, have been shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 6, P. 31–37

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, outer membrane protein F (OprF), toxoid, recombinant pseudomonas vaccine (RPV)

## ВВЕДЕНИЕ

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) относится к условно патогенным грамотрицательным бактериям и является одним из основных возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний человека, причиняющих существенный социально-экономический ущерб во всех странах мира. Особенностью возбудителя является высокая устойчивость к различным факторам внешней среды и способность быстро вырабатывать устойчивость к применяемым антибактериальным препаратам [6, 11, 13]. Поэтому исследователи разных стран осуществляют разработку иммунобиологических лекарственных средств, предназначенных для решения проблемы синегнойной инфекции [1, 9, 10].

В ФГБНУ НИИВС имени И. И. Мечникова проводятся исследования с целью создания рекомбинантной вакцины для профилактики синегнойной инфекции. В качестве компонентов вакцины предложены рекомбинантная форма белка F наружной мембраны (OprF) [3] и рекомбинантный делеционный вариант экзотоксина А (анатоксин) [4]. Эти белки, содержащие дополнительную гистидиновую пептидную последовательность, синтезированы в клетках *Escherichia coli* и очищены методом аффинной хроматографии на никель-активированных сорбентах. Рекомбинантные белки-антигены, сорбированные на гидроокиси алюминия, обеспечивали защиту мышей от экспериментальной синегнойной инфекции, а их совместное введение животным приводило к аддитивному эффекту [5].

Полученные результаты послужили основанием для конструирования кандидатной рекомбинантной вакцины, оптимизации ее состава, разработки технологии получения, по которой произведены три экспериментальные серии. Для внедрения препарата в практику здравоохранения должны быть проведены доклинические и клинические исследования полученных трех экспериментальных серий, предусмотренные Федеральным законом «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 N 61-ФЗ [2, 7].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились три экспериментальные серии рекомбинантной вакцины синегнойной (PBC): № 010617, № 020717 и № 030717. Вакцина сконструирована на основе рекомбинантного белка OprF [2] и рекомбинантного анатоксина [3], которые были синтезированы в клетках *Escherichia coli* и очищены в колонках с Ni-сефарозой (GE Healthcare, Швеция).

Подлинность рекомбинантных белков подтверждали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Лэммли и иммуноблоттинга, проводимых в соответствии с общепринятыми методиками [8, 12]. При иммуноблоттинге использовали кроличьи сыворотки крови против рекомбинантного белка OprF [3] и рекомбинантного анатоксина [4].

Стерильность препарата оценивали методом прямого посева по ОФС42-0066-07 на тиогликолевую и соево-казеиновую жидкие среды. Определение концентрации эндотоксинов в препаратах вакцины проводили в количественном хромогенном ЛАЛ-тесте по конечной точке по методу, указанному в ГФ XIII «ОФС Бактериальные эндотоксины» 42-0062-07 (Метод Е) [2]. Аномальную токсичность оценивали на мышах при внутрибрюшинном введении и морских свинках при подкожном введении. Анафилактическую активность исследовали на морских свинках, которым в течение трех дней препараты вводили подкожно, а затем на 21 сутки осуществляли внутривенное введение. Оценку реакции гиперчувствительности замедленного типа проводили на мышах, которым вводили PBC по одной прививочной дозе внутрибрюшинно трехкратно с интервалом в три суток. Через 7 суток после заключительной инъекции в подушечку одной из задних лап вводили одну прививочную дозу в объеме 0,05 мл, а во вторую лапу — 0,05 мл физиологического раствора. Уровень специфической воспалительной реакции оценивали через 24 часа по разнице в массе конечностей.

Для оценки иммуногенной активности мышам внутрибрюшинно вводили 1 дозу вакцины в объеме 0,5 мл с двухнедельным интервалом. Через 14 дней после курса иммунизации животных заражали живой вирулентной культурой *P. aeruginosa* (штамм PA-103), выращенной на агаризованной среде Хоттингера. ЛД<sub>50</sub> вычисляли по формуле Кербера в модификации Ашмарина — Воробьева.

Работа выполнена с использованием штаммов микроорганизмов ЦКП Коллекция НИИВС им.И.И.Мечникова.

Все работы с животными проводили в соответствии с положениями «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения серий рекомбинантной синегнойной вакцины были синтезированы по три серии рекомбинантного белка OprF и рекомбинантного анатоксина. Расчетная молекулярная масса рекомбинантного белка OprF составляла 38,9 кДа, а молекулярная масса рекомбинантного анатоксина — 65,8 кДа. При анализе методом электрофореза в полиакриламидном геле полученных серий рекомбинантного белка OprF определен белок размером около 40 кДа, а в сериях рекомбинантного анатоксина — размером около 65 кДа, что соответствовало расчетным параметрам рекомбинантных антигенов. Подлинность рекомбинантных белков оценивали по их специфическому взаимодействию с иммунными сыворотками к OprF [3] и к анатоксину [4]. Перед сведением оба компонента были подвергнуты стерилизующей фильтрации.

В результате сведения рекомбинантных белков и последующей сорбции на геле гидроокиси алюминия получены три серии PBC: № 010617, № 020717 и № 030717. В одной дозе которой в объеме 0,5 мл содержится 25 мкг рекомбинантного белка OprF, 50 мкг рекомбинантного анатоксина и 225 мкг гидроксида алюминия. Для всех серий подтверждена стерильность.

Определение количества эндотоксина в сериях вакцины проводили в хромогенном ЛАЛ-тесте по конечной точке. Препараты серий № 010617, № 020717 и № 030717 содержали: 35, 1,3 и 1,1 единиц эндотоксина (ЕЭ)/мл, соответственно (табл. 1).

При исследовании аномальной токсичности препаратов мышам вводили 0,5 мл вакцины (1 человеческая доза) внутривенно, а морским свинкам вводили подкожно по 1 мл вакцины (2 человеческие дозы). На каждую серию препарата использовали пять мышей и две морские свинки. Признаков интоксикации и снижения массы тела животных по сравнению с исходной не регистрировали. Ни у одной опытной морской свинки не развился некроз и/или абсцесс в месте введения. В конце опыта все экспериментальные животные были живы и прибавили в весе (табл. 2).

При исследовании анафилактической активности рекомбинантной вакцины, проводимом на морских свинках, формировали две опытные и две контрольные группы по десять особей в каждой. В течение трех дней животным вводили подкожно: животным первой контрольной группы физиологический раствор, животным второй контрольной и первой опытной группы — одну человеческую дозу (0,5 мл) РВС, животным второй опытной группы — десять человеческих доз (5 мл) РВС. Через 21 день после первой иммунизации животным контрольных групп вводили внутривенно физиологический раствор, а животным опытных групп — несорбированные рекомбинантные белки из расчета по три прививочные дозы антигенов на одну особь. При наблюдении за животными использовали следующую классификацию симптомов: А — повышение температуры тела более, чем на 1°C; Б — четко выраженные частые почесывания, единичные чиханья, понижение температуры тела; В — спастический кашель, боковое положение животного с выделением кала и мочи; Г — спазм дыхательных путей, конвульсивные прыжки, судороги и гибель животного, как правило, на 5 минуте. У большинства животных не наблюдали никаких реакций. Четко выраженные частые почесывания, единичные чиханья, повышение температуры тела наблюдали у половины животных, которым вводили десятикратную прививочную дозу. Все эти симптомы проходили в течение часа (табл. 3).

Для оценки реакции гиперчувствительности замедленного типа мышам трехкратно внутривенно с интервалом в трое суток вводили по одной дозе РВС, используя по десять мышей на каждую серию. Через 7 суток после заключительной инъекции в подушечку одной из задних лап вводили одну прививочную дозу РВС в объеме 0,05 мл. Во вторую лапу вводили физиологический раствор в том же объеме.

Таблица 1. Определение бактериальных эндотоксинов в рекомбинантной вакцине синегнойной (РВС)

Серия РВС	Разведение препарата	ОП при длине волны 405 нм	Содержание эндотоксина, ЕЭ/мл
№ 010617	1:10	1,383	>1,2
	1:100	0,825	0,35
	1:1000	0,161	0,01
	1:10000	0,080	Не опр.
	1:1000000	0,070	Не опр.
№ 020717	1:10000000	0,081	Не опр.
	1:10	0,392	0,13
	1:100	0,096	Не опр.
	1:1000	0,083	Не опр.
	1:10000	0,071	Не опр.
№ 030717	1:1000000	0,190	0,03
	1:10000000	0,074	Не опр.
	1:10	0,345	0,11
	1:100	0,106	Не опр.
	1:1000	0,079	Не опр.
	1:10000	0,099	Не опр.
	1:1000000	0,085	Не опр.
	1:10000000	0,078	Не опр.

Таблица 2. Результаты оценки токсичности экспериментальных серий вакцины рекомбинантной синегнойной (РВС)

Серия РВС	Масса животного, г (по 5 гол. на серию)		Масса морской свинки, г (по 2 гол. на серию)	
	начало опыта	через 7 дней	начало опыта	через 7 дней
№ 01062017	19,8	22,0	265	310
	19,5	22,1	260	309
	18,7	21,5		
	18,5	21,0		
№ 02072017	19,0	22,3		
	19,7	22,5	270	318
	19,7	22,4	262	312
	19,0	22,0		
№ 03072017	20,0	23,2		
	18,9	21,5		
	19,5	22,3	255	310
	19,0	22,2	263	316
Контрольные животные	19,6	22,8		
	18,4	22,0		
	19,1	21,8		
	19,2	22,0	260	310
	19,9	22,7	257	313
	18,9	22,5		
	18,6	21,8		
	19,4	22,2		

Таблица 3. Результаты оценки анафилактической активности экспериментальных серий вакцины рекомбинантной синегнойной (РВС)

Степень выраженности реакции	Количество особей			
	Трёхкратное с интервалом в 1 сутки подкожное введение препарата			
	физ. р-р	1 чел. доза РВС		10 чел. доз РВС
	Через 21 сут. после первой инъекции внутрив. введения физ. р-ра	Через 21 сут. после первой инъекции внутрив. введения 3 привив. доз РВС		
А	0	2	1	0
Б	0	2	0	5
В	0	0	0	0
Г	0	0	0	0
Отсутствие реакции	10	6	9	5

Результат регистрировали через 24 часа путем определения массы опытной и контрольной лап. Уровень специфической воспалительной реакции оценивали по разнице в массе конечностей. Индекс реакции выражали в процентах прироста массы лапки, в которую вводили вакцину, по отношению к массе контрольной лапки (табл. 4).

Защитные свойства препаратов экспериментальных серий вакцины изучали на мышах, которых иммунизировали внутрибрюшинно двукратно с двухнедельным интервалом. Через две недели после курса иммунизации животных заражали возрастающими дозами, с двукратным шагом, живой вирулентной культурой *P. aeguginosa* штамма РА-103 (от 6,25 до 100 млн микробных клеток (м.к.)). Индексы эффективности защитных свойств (отношение ЛД<sub>50</sub> иммунизированных животных к ЛД<sub>50</sub> контрольной группы) для трех серий соответствовали: 3,3; 3,0 и 3,3 (табл. 5).

Таблица 4. Результаты оценки гиперчувствительности замедленного типа у мышей на введение рекомбинантной синегнойной вакцины (РВС)

Серия РВС	Масса контрольной лапки, г	Масса опытной лапки, г	Индекс реакции, %
№ 01062017	0,13±0,004	0,16±0,008	18,9
№ 02072017	0,14±0,004	0,16±0,009	21,4
№ 03072017	0,14±0,004	0,16±0,006	19,3

Таблица 5. Результаты оценки иммуногенности экспериментальных серий вакцины рекомбинантной синегнойной (РВС)

Препарат	Доза заражения, млн м.к.	Количество мышей павших/выживших	ЛД <sub>50</sub> , млн м.к.	ИЭ
РВС, серия № 01062017	100	7/3	66	3,3
	50	2/8		
	25	2/8		
	12,5	0/10		
	6,25	0/10		
РВС, серия № 02072017	100	7/3	61,6	3
	50	3/7		
	25	2/8		
	12,5	0/10		
	6,25	0/10		
РВС, серия № 03072017	100	6/4	66	3,3
	50	3/7		
	25	1/9		
	12,5	1/9		
	6,25	0/10		
Контроль (интактные мыши)	50	10/0	20,3	—
	25	6/0		
	12,5	2/8		
	6,25	0/10		
	3,125	0/10		

При проведении исследований наработаны компоненты кандидатной вакцины: рекомбинантный белок OrgF и рекомбинантный анатоксин. Их подлинность подтверждена электрофорезом и иммуноблоттингом. В результате их очистки получены стерильные и иммуногенные препараты, которые вызывали защиту иммунизированных мышей (табл. 5). При получении РВС компоненты смешивались в следующей пропорции: 1 часть рекомбинантного белка OrgF и 2 части рекомбинантного анатоксина, к которым добавляли в качестве адьюванта гель гидроксида алюминия. Это оптимальное соотношение рекомбинантных антигенов в вакцине было подобрано в предыдущих исследованиях [5]. Всего получили три серии РВС, которые расфасованы и заложены на хранение.

Препараты рекомбинантных белков при синтезе в бактериальных клетках могут содержать токсические примеси продуцента. Поэтому важным этапом явилось подтверждение отсутствия таковых в вакцинных препаратах. Согласно «ОФС42-0062-07. Бактериальные эндотоксины» пороговая пирогенная доза для препаратов парентерального введения составляет 5 ЕЭ/кг. Исходя из предположения, что вес вакцинируемых пациентов не будет менее 20 кг, а объем вводимой вакцины составляет 0,5 мл, порог пирогенности для вакцины составляет 200 ЕЭ/мл. Таким образом, можно утверждать, что препараты рекомбинантных белков являются высокоочищенными от примеси эндотоксина, а опытные серии вакцины на их основе являлись апиrogenными. Экспериментально на мышах и морских свинках показано отсутствие аномальной токсичности препаратов. При исследовании анафилактической активности рекомбинантной вакцины выявлены слабо выраженные симптомы аллергической реакции при введении животным предполагаемых десяти человеческих доз вакцины. Эти симптомы проходили в течение часа. При оценке реакции гиперчувствительности замедленного типа в ответ на введение мышам рекомбинантной вакцины выявлено отсутствие выраженной реакции на препарат. При исследовании защитных свойств трех серий вакцины подтверждена их иммуногенность, что выражалось в выживаемости иммунизированных мышей с индексом эффективности не менее чем 3,0.

Таким образом, проведенные исследования подтвердили эффективность и безопасность препаратов трех экспериментальных серий рекомбинантной вакцины, предназначенной для профилактики инфекций, вызываемых синегнойной палочкой.

*Работа выполнена в соответствии с Государственным Контрактом от 28 апреля 2017 г. № 14.Н08.11.0135 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, предназначенной для профилактики инфекций, вызываемых синегнойной палочкой».*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Благовидов Д.А., Костинов М.П., Симонова О.И. и др. Переносимость вакцины против *P. aeruginosa* у детей с муковисцидозом и врожденными пороками развития легких. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 2 (87):55-66.
2. Государственная фармакопея XIII РФ. М, 2015.
3. Калошин А.А., Гатыпова Е.В., Михайлова Н.А. Получение рекомбинантных форм белка F наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммуногенных свойств. Биотехнология. 2011, 2:74-84.
4. Калошин А.А., Исаков М.А., Михайлова Н.А., Вертиев Ю.В. Получение рекомбинантной атоксической формы экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012, 154(9):330-335.
5. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств комплекса рекомбинантного белка F наружной мембраны и рекомбинантного анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник Российской Академии Медицинских Наук. 2016, 71(1):5-10.
6. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А. и др. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2015, 17(3):170-186.
7. Миронов А.Н., Меркулов В.А., Бунатян Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические препараты). Часть вторая. М., Издание ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2013.
8. Остерман Л.Д. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот, 1981.
9. Doring G., Pier G.B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine. 2008, 26(8):1011-1024.

10. Le Moigne V., Gaillard J.L., Herrmann J.L. Vaccine strategies against bacterial pathogens in cystic fibrosis patients. *Med. Mal. Infect.* 2016 Feb;46(1):4-9.
11. Ma J.G., An J.X. Deep sternal wound infection after cardiac surgery: a comparison of three different wound infection types and an analysis of antibiotic resistance. *J. Thorac. Dis.* 2018 Jan;10(1):377-387.
12. Sambrook J.F., Russell D.W. *Molecular Cloning*, 2001.
13. Zowalaty M.E., Thani A.A., Webster T.J. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol.* 2015;10(10):1683-706.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*И.В.Савельева, А.Н.Куличенко, В.Н.Савельев, Д.А.Ковалев, О.В.Васильева, А.М.Жиров, Е.И.Еременко, Е.И.Подопригора, Б.В.Бабенюшев, И.В.Кузнецова, Л.В.Гусева*

## **MLVA-ТИПИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ VIBRIO CHOLERAЕ BIOTYPE EL TOR, ИЗОЛИРОВАННЫХ В РОССИИ И УКРАИНЕ В ПЕРИОД СЕДЬМОЙ ПАНДЕМИИ ХОЛЕРЫ**

Ставропольский противочумный институт

*Цель.* Провести в сравнительном аспекте MLVA-типирование генетически измененных холерных вибрионов биовара Эль Тор, выделенных от больных в период эпидемии (1994 г.) и вспышек (1993, 1998 гг.) в Дагестане, с изолятами в г. Мариуполе (Украина) в 1994—2011 гг., в Москве (2010, 2012 гг.), Индии (1964, 2006, 2007 гг.), Бангладеш (1991, 1994, 2001, 2004 гг.) и установить филогенетические связи между штаммами холерных вибрионов, изолированных в разные годы на данных территориях, выяснить источник их заноса. *Материалы и методы.* MLVA-типирование проводили в ПЦР по 5 вариабельным локусам 35 клинических штаммов генетически измененных *Vibrio cholerae* биотуре El Tor. Полученные ампликоны изучали в системе автоматического капиллярного электрофореза Experion («Bio Rad Laboratories», США). Для филогенетического анализа наряду с MLVA-генотипами 35 штаммов *Vibrio cholerae* из коллекции института использовали опубликованные генотипы штаммов, выделенных в Индии, Бангладеш, Гаити. *Результаты.* Исследуемые штаммы холерного вибриона отнесены к 21 MLVA-типам, подразделяющимся на 2 основные клады и 1 отдельную ветвь с клональными кластерами и субкластерами, каждый из которых содержит близкородственные штаммы геновариантов холерного вибриона, имеющих различную степень филогенетического родства — полную или частичную идентичность аллельных профилей пяти вариабельных локусов. Установлены источники заноса генетически измененных *Vibrio cholerae* биотуре El Tor в Россию и Украину из неблагополучных по холере Индии, Бангладеш, Азербайджана и стран Ближнего Востока. *Заключение.* Полученные данные свидетельствуют о полиморфизме MLVA-типов генетически измененных штаммов холерного вибриона биовара Эль Тор, эволюционно сформировавшихся в разные годы и вызвавших эпидемии или вспышки холеры на различных территориях в различные временные периоды течения седьмой пандемии холеры, а также позволяют предположить поликлональное происхождение геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор и источник их заноса на территорию Российской Федерации и Украины.

Журн. микробиол., 2018, № 6, С. 37—43

Ключевые слова: генетически измененные варианты холерного вибриона биовара Эль Тор, MLVA-типирование, источник заноса геновариантов в Россию и Украину, полиморфизм, поликлональное происхождение геновариантов

*I.V.Savelieva, A.N.Kulichenko, V.N.Saveliev, D.A.Kovalev, O.V.Vasilieva, A.M.Zhirov, E.I.Eremenko, E.I.Podoprighora, B.V.Babenyshv, I.V.Kuznetsova, L.V.Guseva*

## **MLVA-TYPING OF CLINICAL STAMPS OF GENETICALLY CHANGED VIBRIO CHOLERAЕ BIOTYPE EL TOR INSULATED IN RUSSIA AND UKRAINE IN THE PERIOD OF SEVENTH PANDEMIC CHOLERA**

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* Conduct in a comparative aspect MLVA-typing of genetically altered cholera vibrio biovar *El Tor*, isolated from patients during the epidemic (1994) and outbreaks (1993, 1998) in Dagestan with isolates in Mariupol (Ukraine) in 1994-2011 in Moscow (2010, 2012), India (1964, 2006, 2007), Bangladesh 1991,