



Анализ заболеваемости людей бруцеллёзом и молекулярно-биологическая характеристика изолятов *Brucella melitensis* на длительно неблагополучных по бруцеллёзу территориях юга европейской части России

Хачатурова А.А.✉, Пономаренко Д.Г., Ковалев Д.А., Германова А.Н., Лукашевич Д.Е., Русанова Д.В., Сердюк Н.С., Семенко О.В., Жиров А.М., Катунина Л.С., Куличенко А.Н.

Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Аннотация

Введение. Для совершенствования эпидемиологического надзора за бруцеллёзом в России необходимы подробный анализ заболеваемости и изучение особенностей штаммов бруцелл, циркулирующих на территориях страны, где отмечается стойкое эпизоотолого-эпидемиологическое неблагополучие по бруцеллёзу.

Цель исследования — изучение современных особенностей эпидемического процесса бруцеллёза и молекулярно-биологический анализ изолятов бруцелл на территории длительно неблагополучных по бруцеллёзу субъектов Южного (ЮФО) и Северо-Кавказского (СКФО) федеральных округов — Республики Дагестан (РД), Республики Калмыкия (РК) и Ставропольского края (СК).

Материалы и методы. Анализ заболеваемости бруцеллёзом в СКФО и ЮФО проводили на основе данных Управлений Роспотребнадзора за 2011–2020 гг. Изучено 56 культур *Brucella melitensis*, выделенных в 1999–2019 гг. от заболевших бруцеллёзом, постоянно проживающих на территориях РД, РК и СК.

Результаты. Ключевой фактор, способствующий возникновению случаев заболевания людей бруцеллёзом на территории юга европейской части России, — сохранение в регионе стойкого эпизоотического неблагополучия по бруцеллёзу мелкого и крупного рогатого скота. К ведущим сопутствующим факторам можно отнести: наличие в регионе «скрытых» эпизоотических очагов, неконтролируемых объектов производства пищевой продукции животноводства и её нелегальную реализацию населению, несанкционированное перемещение животных и животноводческих грузов, несвоевременную сдачу (передержку) большого скота. Результаты молекулярно-биологического анализа штаммов *B. melitensis* указывают на циркуляцию смешанной популяции бруцелл, в целом характерной для всего региона, без выраженной приуроченности изолятов к отдельным административным территориям. Вместе с тем всю изученную выборку штаммов можно условно распределить на две популяции (72 и 28% выборки), различающиеся профилями MLVA-16-генотипов по вариабельности локуса *Bruc* 19, что позволяет ассоциировать часть изученной популяции с территорией их выделения.

Обсуждение. Полученные данные позволяют научно обосновать возможность рассматривать длительно неблагополучные территории ЮФО и СКФО как единый (общий), стойкий и длительно активный антропоургический эпизоотический очаг с циркулирующей смешанной, но характерной для региона популяцией бруцелл.

Ключевые слова: бруцеллёз, *Brucella melitensis*, генотипирование, эпидемиология

Этическое утверждение. В исследовании использованы культуры *B. melitensis* от анонимизированных заболевших бруцеллёзом людей из коллекции Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Хачатурова А.А., Пономаренко Д.Г., Ковалев Д.А., Германова А.Н., Лукашевич Д.Е., Русанова Д.В., Сердюк Н.С., Семенко О.В., Жиров А.М., Катунина Л.С., Куличенко А.Н. Анализ заболеваемости людей бруцеллёзом и молекулярно-биологическая характеристика изолятов *Brucella melitensis* на длительно неблагополучных по бруцеллёзу территориях юга европейской части России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(1):63–74.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-185>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-185>

Analysis of cases of brucellosis in humans and molecular-biological characteristics of *Brucella melitensis* strains in regions of South European Russia with a high brucellosis incidence

Anna A. Khachaturova[✉], Dmitriy G. Ponomarenko, Dmitriy A. Kovalev, Anastasia N. Germanova, Daria E. Lukashovich, Diana V. Rusanova, Natalia S. Serdyuk, Oksana V. Semenko, Andrey M. Zhiron, Liudmila S. Katunina, Alexandr N. Kulichenko

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia

Abstract

Introduction. To improve the epidemiological surveillance of brucellosis in Russia, a detailed analysis of incidence and characteristics of *Brucella melitensis* strains circulating in the territories of the country where there is a persistent epizootic and epidemiological problem with brucellosis is required.

Purpose of the study. To study current trends in the brucellosis epidemic process and perform molecular analysis of *Brucella* isolates from the territories of Southern and North Caucasian Federal Districts with long lasting unfavorable situation with brucellosis — the Republics of Dagestan (RD), Kalmykia (RK) and Stavropol Krai (SK).

Materials and methods. The analysis of the brucellosis incidence in the North Caucasian Federal District and the Southern Federal District was carried out on the basis of data from the Rospotrebnadzor Departments for the period 2011–2020. Total 56 cultures of *Brucella melitensis*, isolated in 1999–2019 from patients with brucellosis that permanently resided in RD, RK and SK were studied.

Results. The key factor contributing to the epidemic manifestations of brucellosis in the south of the European part of Russia is the persistence of epizootic foci in cattle and small ruminants. The leading concomitant factors are as follows: the presence in the region of "hidden" epizootic foci, uncontrolled production of food products of animal husbandry and its illegal sale to customers, unauthorized movement of animals and livestock products, untimely delivery (concealment) of sick cattle for stamping out. Results of molecular analysis of *B. melitensis* strains indicate the circulation of a mixed population of brucella, which is generally characteristic of the entire region, without a pronounced confinement of isolates to separate administrative territories. At the same time, the entire studied sample of strains can be divided into two groups (72% and 28% of strains) based on MLVA-16 genotypes by the variability in the Bruce 19 locus, which makes it possible to associate a part of the studied strains with the territory of their isolation.

Discussion. The data obtained make it possible to scientifically substantiate the possibility of considering the affected territories of the Southern Federal District and the North Caucasian Federal District as a single common persistent active anthroponotic epizootic focus with circulation of a mixed, but typical for the region population of *Brucella* strains.

Keywords: brucellosis, *Brucella melitensis*, genotyping, epidemiology

Ethics approval. The study used cultures of *B. melitensis* from anonymized people with brucellosis from the collection of the Stavropol Research Anti-Plague Institute

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Khachaturova A.A., Ponomarenko D.G., Kovalev D.A., Germanova A.N., Lukashovich D.E., Rusanova D.V., Serdyuk N.S., Semenko O.V., Zhiron A.M., Katunina L.S., Kulichenko A.N. Analysis of cases of brucellosis in humans and molecular-biological characteristics of *Brucella melitensis* strains in regions of South European Russia with a high brucellosis incidence. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(1):63–74.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-185>

Введение

Всемирная организация здравоохранения относит бруцеллёз к одному из самых опасных зоонозов в мире. Наибольшее распространение бруцеллёз получил в странах с интенсивным разведением мелкого (МРС) и крупного (КРС) рогатого скота и, как правило, низкой культурой ведения животноводства. На неблагоприятных территориях характер эпидемических проявлений бруцеллёза тесно связан с актив-

ностью эпизоотического бруцеллёзного процесса, а также региональными особенностями разведения животных, структуры хозяйств и социально-бытовых взаимоотношений сельского населения [1].

В России в последние 10 лет отмечается тенденция к улучшению эпидемиологической ситуации на фоне длительной напряжённой эпизоотической обстановки по бруцеллёзу МРС и КРС. Среднее многолетнее (2011–2020 гг.) количество случаев бруцеллёза

в год составляет 350. К наиболее неблагополучным по бруцеллёзу относят регионы юга европейской части — Северо-Кавказский (СКФО) и Южный (ЮФО) федеральные округа, где было выявлено 70–90% от заболеваемости бруцеллёзом в России [2–5].

Административные территории СКФО и ЮФО характеризуются разнообразием климато-географических и экономических условий. При этом данный регион страны имеет специфические черты, общие для неблагополучных по бруцеллёзу субъектов: интенсивное разведение сельскохозяйственных животных, содержание в личном подворье большого количества часто не зарегистрированного в установленном порядке МРС и КРС, традиционные национально-бытовые особенности выращивания домашних животных и кустарного производства мясо-молочных продуктов, наличие сложившейся десятилетиями системы неофициальных бартерно-торговых взаимоотношений среди производителей и потребителей сельхозпродукции, активная сезонная трудовая миграция населения [6–9].

Вместе с тем длительное эпизоотолого-эпидемиологическое неблагополучие по бруцеллёзу на европейском юге России во многом обусловлено дальнейшей тенденцией к разукрупнению хозяйств общественного сектора и изменению социально-экономической формации в сельском хозяйстве региона, что влечёт за собой увеличение количества индивидуальных, фермерских и акционерных хозяйств разного направления деятельности. В этих условиях ключевое значение приобретает установление закономерностей и современных особенностей эпидемиологического проявления этой инфекции на отдельных административных территориях России, а также выявление факторов, способствующих сохранению и распространению бруцеллёзной инфекции.

К наиболее эпидемиологически опасному виду бруцелл относится *Brucella melitensis*. Широкое распространения *B. melitensis* в популяции МРС, потенциально высокий риск миграции бруцелл козье-овечьего вида на КРС и другие виды животных обеспечивают стойкое эпизоотическое неблагополучие и частые эпидемические проявления инфекции в регионе. С целью совершенствования мониторинга инфекции на территории России необходим анализ особенностей (профиля) фенотипических и молекулярно-генетических характеристик штаммов бруцелл, циркулирующих на территориях страны, где отмечается стойкое эпизоотолого-эпидемиологическое неблагополучие по бруцеллёзу.

Цель исследования: изучение современных особенностей эпидемического процесса бруцеллёза и молекулярно-биологический анализ изолятов бруцелл на территории длительно неблагополучных по бруцеллёзу субъектов ЮФО и СКФО — Республики Дагестан (РД), Республики Калмыкия (РК) и Ставропольского края (СК).

Материалы и методы

Анализ эпидемической ситуации в СКФО и ЮФО проведён на основе изучения данных Управлений Роспотребнадзора в соответствующих субъектах РФ по результатам эпидемиологических исследований случаев заболевания людей бруцеллёзом за 2011–2020 гг.

Для выявления фенотипических и молекулярно-генетических особенностей штаммов бруцелл, циркулирующих на неблагополучных территориях юга европейской части России, было изучено 56 культур *B. melitensis* из коллекции Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора, которые, согласно паспортным данным культур, были выделены в 1999–2019 гг. от анонимизированных заболевших бруцеллёзом людей, постоянно проживающих на территориях РД, РК и СК.

Для определения видовой и биоваровой принадлежности культур бруцелл проводили расширенную дифференциацию: оценку потребности возбудителя бруцеллёза в повышенном содержании CO_2 в атмосфере культивирования, интенсивности продукции сероводорода, устойчивости к микробиологическим красителям (тионин, основной фуксин), агглютиногенности монорецепторными диагностическими сыворотками (*anti-abortionis*, *anti-melitensis*) и лизогенности бруцеллёзными бактериофагами Т6, Wb, F1 и Bk2.

Для изучения сахаролитических свойств штаммов бруцелл использовали среды Гисса, для определения каталазной, уреазной и оксидазной активности — коммерческие наборы «Микро-каталаза-НИЦФ» и «Микро-уреаза-НИЦФ» (Россия), «Micro-la-test» («Erba Lachema») соответственно. Оценка чувствительности изолятов бруцелл к антибактериальным препаратам (АБП) осуществляли диско-диффузионным методом с использованием агара Мюллера–Хинтона по МУК 4.2.2495-09, МУК 3.1.7.3402-16^{1,2} [10].

Проведение генетического типирования *B. melitensis* с использованием MLVA по схеме, предложенной P. Le Fleche и соавт. [11], заключалось в учёте размеров 16 VNTR-локусов *Brucella* spp. [12, 13]. Для сравнительного анализа в исследование были включены 14 штаммов *B. melitensis*, генотипы которых представлены в международной базе данных MLVA-генотипов MLVA bank for Microbes Genotyping [14]. Биоинформатическая обработка данных, построение и визуализация дендрограмм проведены с

¹ Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сальмонеллез, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.2495-09. М., 2010.

² Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза. Официальное издание МУК 3.1.7.3402-16. М., 2017.



Рис. 1. Регистрация случаев бруцеллёза среди людей на административных территориях СКФО в 2011–2020 гг.

Fig. 1. Registration of cases of brucellosis in humans in the administrative territories of SCFO in 2011–2020.

использованием плагина MLVA-plugin пакета программ «BioNumerics® software» и программного онлайн-продукта «PHILOVIZ 2.0 software»³.

Анализ данных осуществляли с использованием языка программирования R [15] (пакет анализа «tidyverse») [16]. Анализ значимости отличий наблюдаемых частот антибактериальной устойчивости проводили с использованием точного теста Фишера. Критическим уровнем статистической значимости различий установлено значение $p < 0,05$. Анализ данных MLVA-типирования методом главных компонент (principal component analysis — PCA) проводили в среде языка R с использованием функции `prcomp` [17–19].

Все работы с биоматериалом и культурами бруцелл проводили в соответствии с требованиями действующих нормативных документов^{4,5}.

³ URL: <http://www.phylloviz.net>

⁴ Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13. М., 2014.

⁵ Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 1.3.2569-09. М., 2010.

Результаты и обсуждение

Эпидемиологическая обстановка по бруцеллёзу на территориях юга европейской части России (преимущественно административные территории СКФО и ЮФО) в последнее десятилетие оставалась достаточно напряжённой, вместе с тем отмечался неустойчивый тренд к уменьшению числа случаев заболевания бруцеллёзом. В 2011–2020 гг. в этих федеральных округах было зарегистрировано 79,7% случаев (2794 случая) от общего количества впервые выявленного бруцеллёза в России. Наибольшее количество случаев было установлено на территории СКФО (2291 случай; 65,3%), где бруцеллёз среди людей в основном регистрировали в РД (1483 случая; 5,03 на 100 тыс. населения) и СК (730 случаев; 2,63 на 100 тыс. населения; **рис. 1**).

По данным эпидемиологического анализа случаев заболевания людей бруцеллёзом в РД было установлено, что среди заболевших преобладают лица в возрасте 18–60 лет (80–85%), мужского пола (70–72%). Доля жителей сельской местности среди больных составила 88–90%, в том числе детей до 17 лет — 14 случаев. В РД в 2011–2020 гг. ежегодно регистрировался самый высокий в России уровень заболеваемости детей бруцеллёзом (в среднем 15 случаев в год, 1,73 на 100 тыс. населения), что

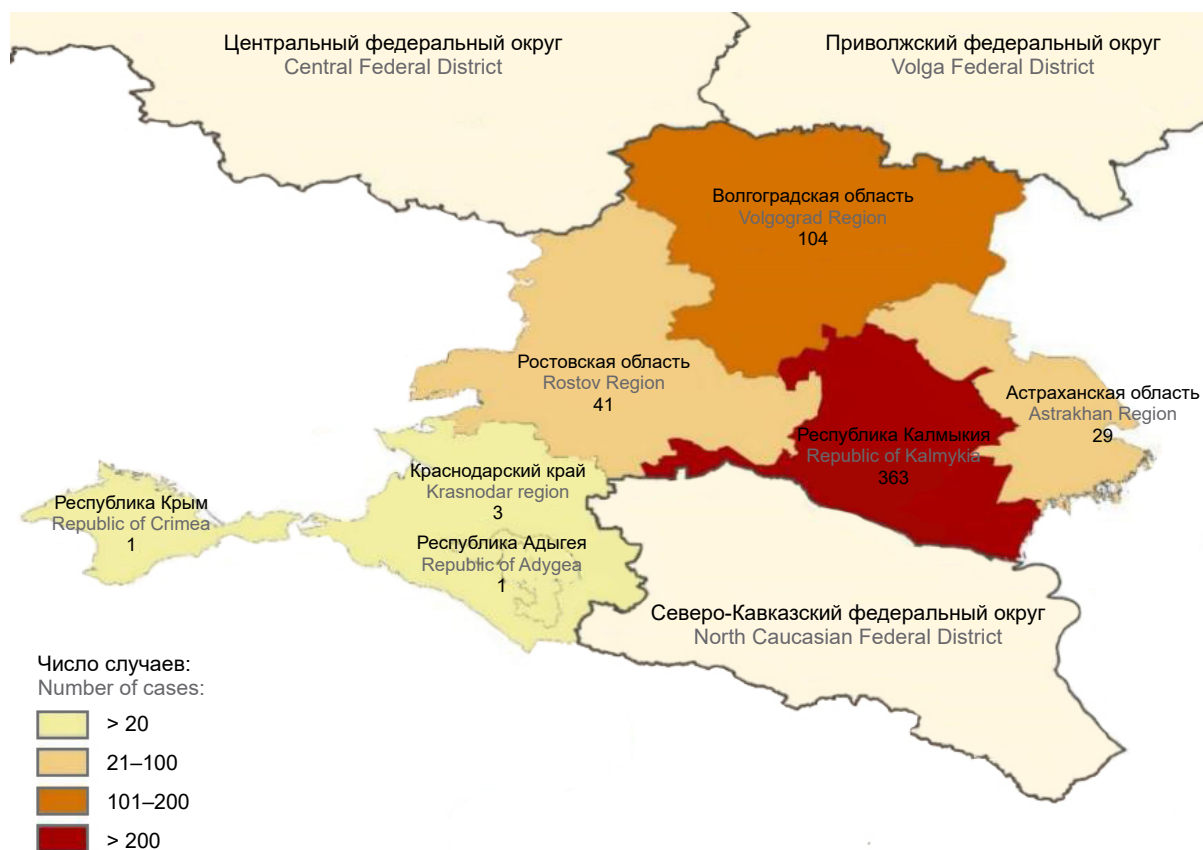


Рис. 2. Регистрация случаев бруцеллёза среди людей на административных территориях ЮФО в 2011–2020 гг.
Fig. 2. Registration of cases of brucellosis in humans in the administrative territories of the Southern Federal District in 2011–2020.

связано с этническими традициями постоянного привлечения детей к обслуживанию домашних животных. В структуре лиц, заболевших бруцеллёзом, 6,4–10% составил профессионально-угрожаемый контингент (ветеринарные работники, зоотехники, пастухи, скотники и др.), около 60% — лица, имеющие личное подворье. Из числа установленных источников инфекции КРС составил 58–62%, МРС — 41–43%. Контактный механизм передачи инфекции (бытовой, прямой путь инфицирования) был установлен в более чем 60% случаев, почти треть составил фекально-оральный (пищевой путь). Бруцеллёз в РД ежегодно регистрировался на территориях более 40 административных субъектов; наиболее часто — у населения, проживающего на территориях Буйнакского, Акушинского, Дахадаевского, Хунзанского, Левашинского районов и Махачкалы.

В СК случаи заболевания людей бруцеллёзом выявлялись в основном в январе, марте и в период с мая по декабрь. Максимальное количество случаев было зарегистрировано в период с июля по август (35–40%). Наиболее часто бруцеллёз подтверждался среди населения, проживающего в сельской местности (82–85%). По данным исследователей [20], бруцеллёз в структуре профессиональных

заболеваний в СК составляет 70–75%. Доля профессионально-угрожаемого контингента (ветеринарные работники, зоотехники, пастухи, скотники, животноводы, работники молочно-товарных ферм и др.) составила в среднем до 12%, индивидуальных владельцев животных — 12–15%. Из установленных в результате эпидрасследований факторов передачи бруцеллёзной инфекции 75–80% составили пищевые продукты животного происхождения (молоко, кисломолочные продукты, мясо, мясные продукты), 22–26% — сырье от животных. В качестве ведущего механизма передачи инфекции был установлен фекально-оральный (пищевой путь). Бруцеллёз в СК наиболее часто регистрировался у населения, проживающего на территориях Левкумского и Нефтекумского районов, имеющих общую границу с энзоотичными по бруцеллёзу территориями РД и РК.

На территории субъектов ЮФО в 2011–2020 гг. было установлено 503 случая бруцеллёза (14,3% от общего количества заболевших бруцеллёзом в России; 0,34 на 100 тыс. населения). Наиболее стойкое эпидемиологическое неблагополучие по бруцеллёзу в округе отмечается на территории РК (рис. 2).

РК относится к субъектам РФ с наиболее высокими показателями заболеваемости бруцеллёзом на 100 тыс. населения, который в среднем за последние

10 лет составил 11,53. Всего в 2011–2020 гг. было установлено 363 случая (в среднем в год 36 случаев) заболевания людей бруцеллёзом, что составило более 64% от всех выявленных случаев бруцеллёза в округе. Бруцеллёз в РК преимущественно регистрировали в январе и с апреля по декабрь, с наибольшим количеством — 55–60% с июня по сентябрь. В отличие от РД и СК, в РК основным источником бруцеллёзной инфекции для людей был МРС (более 70–76% от всех установленных источников). В качестве ведущего механизма передачи инфекции (более 40% из установленных случаев) был подтверждён контактный (бытовой и/или прямой путь инфицирования), преобладающие факторы передачи инфекции — естественные выделения больных бруцеллёзом животных. Бруцеллёз в РК наиболее часто регистрировался у лиц, проживающих на территориях Лаганского, Малодербетовского и Целинного районов. Население этих административных территорий РК в наибольшей степени вовлечено в сферу деятельности по производству животноводческой продукции, особенно мяса (баранина и козлятина, говядина), а также шерсти овец.

Анализ штаммов *B. melitensis*, выделенных на территории юга европейской части России в 1999–2019 гг., показал, что изоляты бруцелл обладали слабой биохимической активностью, типичной для данного вида. Культуры возбудителя бруцеллёза ферментировали D-глюкозу и не сбраживали маннозу, рамнозу и мальтозу. Вместе с тем бруцеллы проявляли оксидазную, уреазную и каталазную активность (см. Приложение⁶).

При определении биоваровой принадлежности бруцелл было установлено, что подавляющее большинство штаммов (70% от изученных культур), изолированных на территории РД, относились к III биовару, 20% — ко II. Среди культур бруцелл, выделенных в СК, также преобладали штаммы III биовара (50%), количество изолятов I и II биоваров составили 30 и 20% соответственно. В РК чаще выделялись культуры I (40%) и II (40%) биоваров.

В результате исследований была определена чувствительность/устойчивость штаммов бруцелл в отношении 13 АБП (рис. 3). Из числа исследованных штаммов 13% показали резистентность к 2 и более антибиотикам. Статистически значимой связи устойчивости бруцелл к отдельному препарату с местом выделения культуры обнаружено не было ($p > 0,05$, точный тест Фишера). Кроме того, статистически значимой связи MLVA-генотипа с профилем антибиотикоустойчивости установить не удалось.

Изучаемые штаммы бруцелл, выделенные из клинического материала в разные годы на юге

России, имели MLVA-генотипы, отличающиеся от штаммов, составляющих Средиземноморский западный и Американский кластеры. После сравнения с базой данных MLVA-генотипов⁷ установлено, что изучаемые штаммы группируются со штаммами, формирующими Средиземноморский восточный кластер, в котором наибольшее родство отмечалось с MLVA-8-генотипами 45 и 42, что согласуется с полученными ранее данными о циркуляции изолятов этих генотипов на территории России и в государствах (Казахстан, Монголия, Китай), граничащих с юго-восточной частью России (Сибирь и Дальневосточные регионы) [13, 21]. Наиболее близкое генетическое родство всех штаммов *B. melitensis*, выделенных на юге европейской части России, выявлено с международным референтным штаммом *B. melitensis* 63/9 (1963 г., Индия) и штаммами, имеющими также азиатское происхождение, выделенными во время вспышки 2013 г. в Казахстане, и изолятами разных годов из Китая за счёт идентичных локусов Bruce 6, Bruce 8, Bruce 11, Bruce 12, Bruce 42, Bruce 45 и Bruce 55.

Панели MLVA-15 и MLVA-16, которые включают переменные локусы Bruce 4, Bruce 7, Bruce 9, Bruce 16 и Bruce 30, позволяют дифференцировать штаммы, выделенные из клинического материала на территориях юга европейской части России, и сопоставлять (ассоциировать) генотипы с местом выделения гемокультур. За счёт вариативности локуса Bruce 19, входящего в панель MLVA-16, удалось дифференцировать штаммы, выделенные на наиболее неблагоприятных и граничащих между собой территориях субъектов ЮФО и СКФО. Так, ранее сгруппированные клинические изоляты из РК и СК сформировали одну группу с числом tandemных повторов 39 (72% выборки) в локусе Bruce 19, а среди штаммов, выделенных в РД, можно выделить популяцию с числом tandemных повторов 41 (28% выборки) в локусе Bruce 19. Штаммы *B. melitensis*, изолированные в разных административных районах РК в 1999–2019 гг., имеют одинаковые MLVA-16-генотипы с частью штаммов из СК, выделенных в 2018–2019 гг. Однако не все штаммы, изолированные в СК (2014, 2018, 2019 гг.), имели вышеуказанные аллели и группировались с идентичными MLVA-16-генотипами штаммов из РК и РД (2012, 2014, 2019 гг.).

В результате кластерного анализа на основании MLVA-генотипирования установлено деление всех штаммов на 3 кластера (рис. 4). Кластеры I и II образованы штаммами, выделенными на территории СК, РК и РД в 1999–2019 гг. В кластер III вошли штаммы из группы сравнения.

В кластере I можно выделить 4 группы, первая образована 3 штаммами из РД, 1 — из РК и 3 — СК.

⁶ Приложение см. на официальном сайте журнала.
URL: <https://microbiol.elpub.ru>

⁷ URL: <https://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/40>

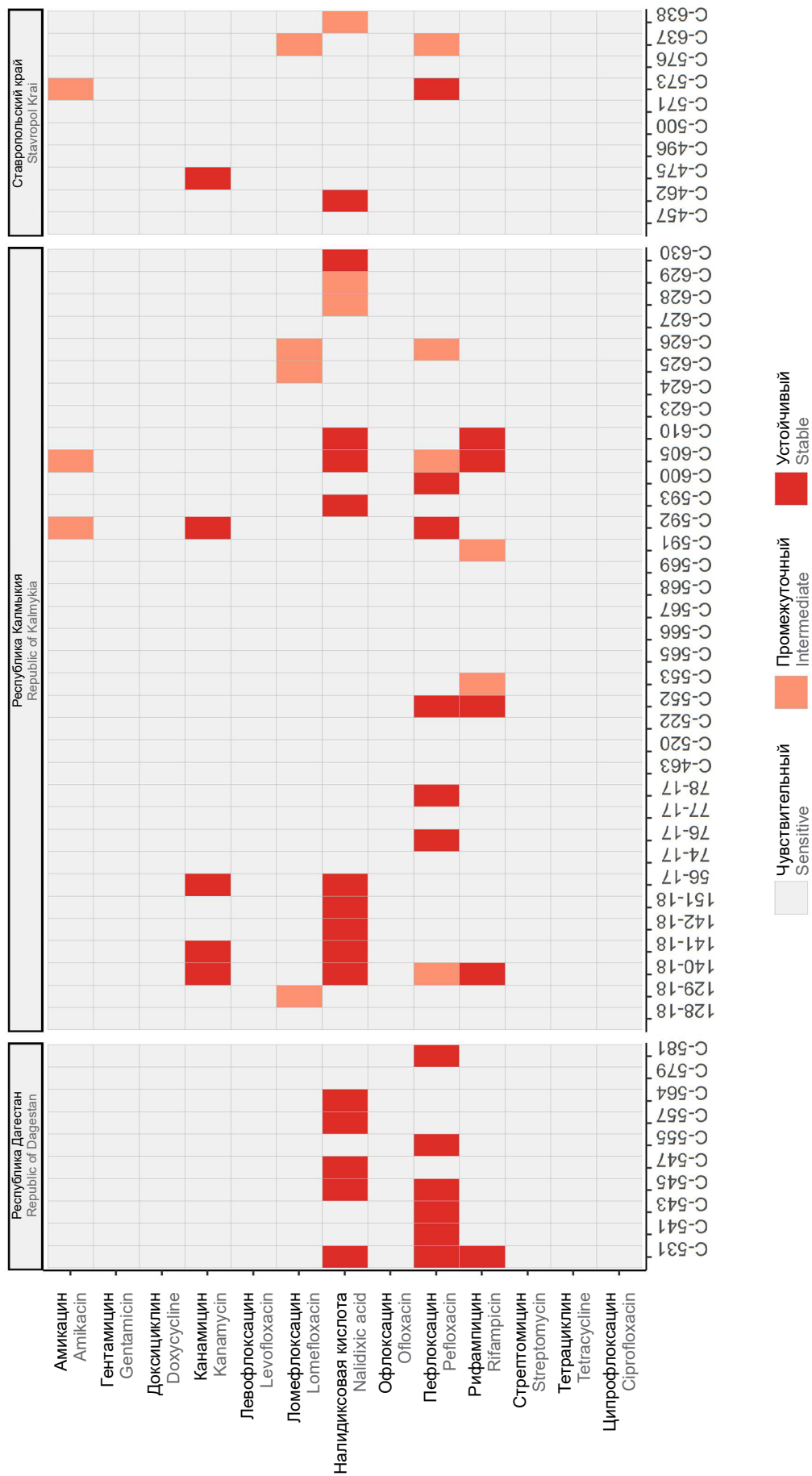


Рис. 3. Результаты оценки чувствительности к АБП штаммов *B. melitensis*.
 Fig. 3. Results of the assessment of sensitivity of *B. melitensis* strains to antibacterial preparations.

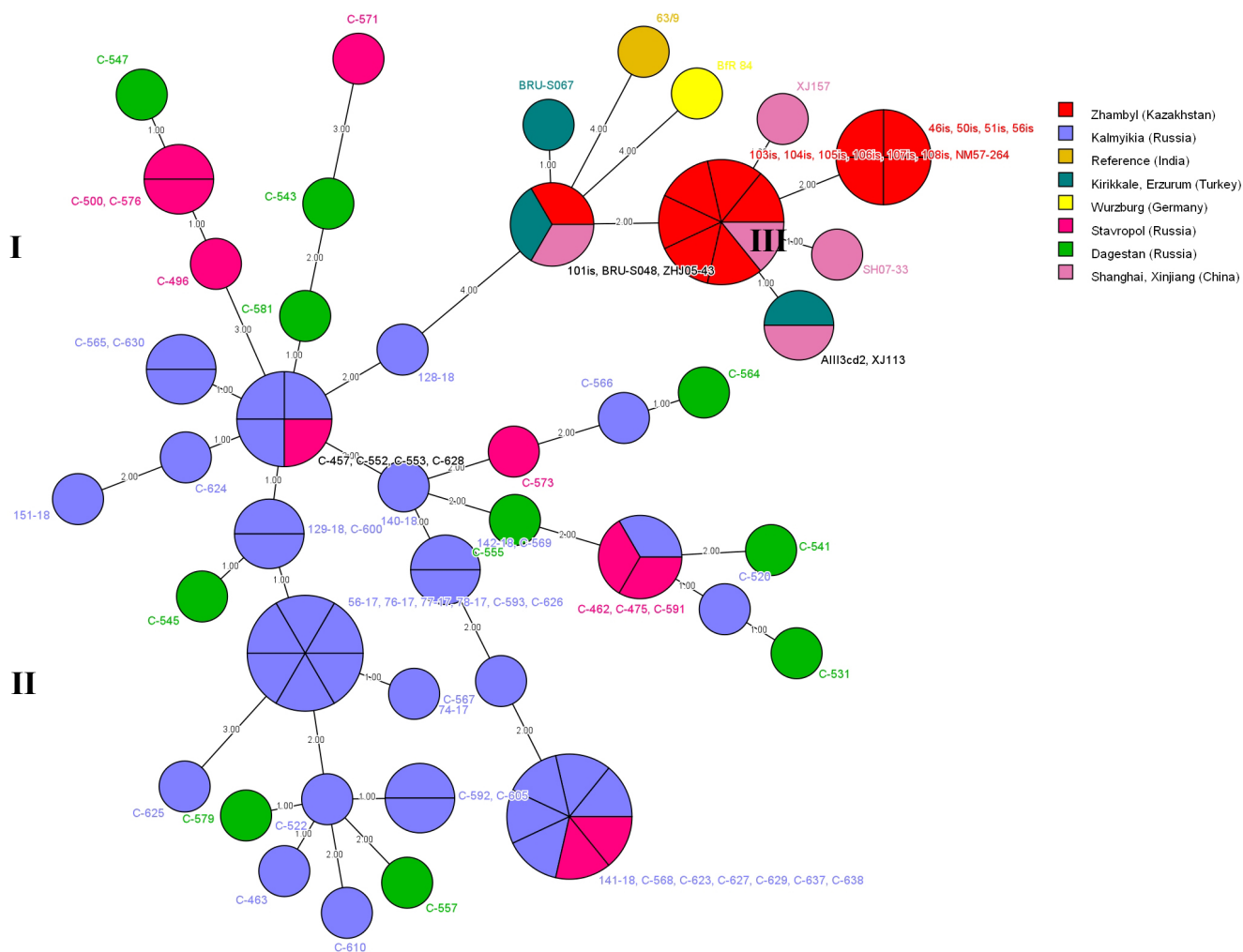


Рис. 4. Дендрограмма *B. melitensis*, построенная на основании данных генотипирования методом MLVA-16, ассоциированная с территорией выделения штаммов.

Fig. 4. Dendrogram for *B. melitensis*, built on the based on the data of genotyping by the MLVA-16 method associated with the territory of strain isolation.

Сопоставление MLVA-генотипов указанных штаммов показывает, что они различаются только по числу повторов 4 переменных локусов (Bruce 19, Bruce 07, Bruce 09, Bruce 16), аллельные варианты других VNTR были идентичны (1, 5, 3, 12, 2, 2, 3, 2, 5, 9, 5, 6).

Вторую группу образовали 3 штамма из СК (2000–2002, 2015 гг.) и 1 из Дагестана (2015 г.), MLVA-профиль которых был идентичным, за исключением локусов Bruce 19 и Bruce 18.

В третью группу вошли 3 штамма, выделенных в 2014 г. на трёх исследуемых территориях и различающихся по локусам Bruce 19, Bruce 04, Bruce 16.

Четвёртую группу составили 10 изолятов из РК (2014, 2018, 2019 гг.) и 2 из СК (2019 г.). Дистальный конец ветви образован 7 штаммами с одинаковым MLVA-профилем (1, 5, 3, 12, 2, 3, 3, 2, 5, 39, 8, 7, 5, 3, 6, 6), выделенными в 2019 г., что говорит об общем происхождении изолятов.

Кластер II состоит из двух групп: одну образовали 3 штамма из РД и 1 штамм из СК, MLVA-генотипы которых отличаются вариантами локусов Bruce 07, Bruce 16, Bruce 30. Вторая, более обширная группа, состоит из изолятов, выделенных на территории 3 регионов в 1999–2019 гг., имеющих различия от 1 до 4 tandemных повторов в локусах (Bruce 19, Bruce 21, Bruce 04, Bruce 07, Bruce 09, Bruce 16, Bruce 30), аллельный вариант остальных локусов был идентичен (1, 5, 3, 12, 2, 2, 3, 2, 5).

Отдельный кластерный комплекс III образован исключительно штаммами группы сравнения, выделенными от людей в Турции, и культурами, выделенными от овец в Казахстане, Турции и Китае, в 2002, 2005, 2008 и 2013 гг. Наиболее генетически близкими к изученным штаммам оказались изоляты из Турции, что связано с географическим положением территории, через которую пролегали торговые пути из Восточной Азии в Европу. Территория

современной Турции часто была промежуточным этапом на пути следования торговых караванов, в том числе с животными и животноводческой продукцией. Вместе с тем известно, что в VI–VII вв. через Северный Прикаспий по территории Северного Кавказа к Черноморскому (Понтийскому) побережью были проложены новые торговые маршруты Великого Шёлкового пути из Китая и Средней Азии. Использование метода главных компонент, основное преимущество которого заключается в уменьшении количества характеристик объекта наблюдения при минимальной потере информации, в качестве метода классификации штаммов по MLVA-генотипу позволило добиться снижения размерности данных путём создания новых переменных (главных компонент) из линейной комбинации исходных характеристик. При визуализации первых двух главных компонент на плоскости штаммы из РД, РК и СК образуют РСА-кластер, обособленный от штаммов внешней группы. Высокая степень пересечения границ РСА-кластеров из юга России, по всей видимости, связана с отсутствием специфичных для региона вариантов VNTR-локусов и значительным сходством MLVA-генотипов (рис. 5).

Заключение

Длительное эпидемиологическое неблагополучие по бруцеллёзу территорий юга европейской части России в полной мере отражает имеющийся масштаб стойкой эпизоотической напряжённости южных регионов по бруцеллёзу. К особенностям эпидемиологической ситуации по бруцеллёзу на территориях РД, РК и СК за последние 10 лет можно отнести:

- отсутствие стойкой тенденции к снижению заболеваемости бруцеллёзом относительно средних многолетних показателей. В последние 10 лет в СКФО и ЮФО регистрируется более 80% случаев от общего количества заболеваемости бруцеллёзом людей и животных в России;
- 44% (7 случаев) от общего количества групповых вспышек в России было зарегистрировано на территориях ЮФО и СКФО. Все случаи группового заболевания людей бруцеллёзом в регионе были выявлены до установления эпизоотического неблагополучия хозяйств, т.е. в «скрытых» (невьявленных) эпизоотических очагах;
- бруцеллёз у людей на неблагополучных территориях юга европейской части России регистрировался в течение всего календарного года. Можно отметить удлинение сезонности заболевания до 8–10 мес (январь–октябрь), иногда без выраженного пика заболеваемости;
- преобладание (75–80%) в структуре контингентов, вовлечённых в эпизоотический про-

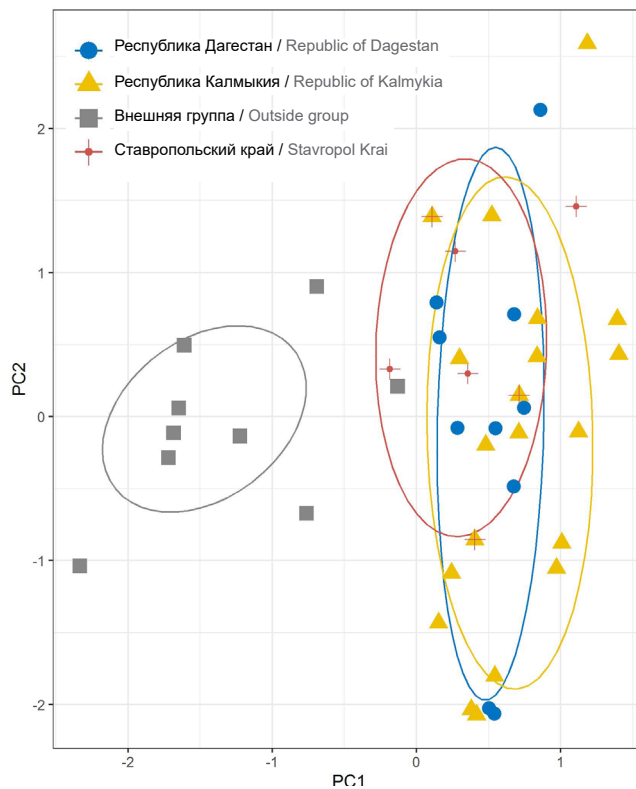


Рис. 5. PCA-анализ классификации штаммов по MLVA-генотипу.

Fig. 5. PCA analysis of the strain classification based on MLVA-genotype.

цесс бруцеллёза, лиц не из контингентов риска (чаще — индивидуальные владельцы животных). Доля лиц из группы профессионального риска (зоотехники и ветеринарные специалисты, чабаны, животноводы, работники молочно-товарных ферм и др.) составила в среднем 7–12%;

- в СК и РД источником бруцеллёзной инфекции для человека чаще был КРС, в РК — МРС. Вместе с тем в РК в последние 10 лет прослеживается тенденция к увеличению роли КРС как источника бруцеллёзной инфекции для людей;
- в РК по сравнению с РД, СК и другими субъектами СКФО у заболевших бруцеллёзом людей наиболее часто регистрировали острые (манифестные) формы течения болезни, что, вероятно, связано с ведущей ролью в качестве источника бруцеллёзной инфекции МРС, носителя наиболее патогенного для человека козье-овечьего вида бруцелл — *B. melitensis*;
- в большинстве (более 80%) случаев заболевания людей бруцеллёзом источником инфекции были животные индивидуального сектора;
- в РД и РК в качестве ведущего был установлен контактный механизм передачи бруцеллёзной инфекции (основные факторы передачи возбудителя бруцеллёза — естественные выделения

больных животных). В СК преобладал фекально-оральный механизм передачи (пищевой путь) инфекции (факторы передачи — молоко, кисломолочные продукты, мясо, мясные продукты);

- в РД и РК бруцеллёз среди людей регистрировали на территории муниципальных образований, в которых отмечается большая доля вовлечённости населения в животноводческую сферу деятельности. В СК бруцеллёз чаще выявлялся среди людей, проживающих в районах, граничащих с РД и РК.

Ключевой фактор, способствующий ежегодному возникновению случаев заболевания людей бруцеллёзом на территории юга европейской части России, — сохранение в регионе стойкого эпизоотического неблагополучия по бруцеллёзу среди эпидемиологически значимых видов КРС и МРС. К сопутствующим факторам риска в субъектах европейского юга России можно отнести: наличие на территории «скрытых» сельскохозяйственных эпизоотических очагов (скрытых бруцеллоносителей среди животных), несоблюдение ветеринарных требований при приобретении, реализации и содержании животных (низкая культура ведения животноводства), наличие несанкционированных внутри- и межсубъектных перемещений животных и животноводческих грузов, несвоевременную сдачу (передержку) больных животных на убой, наличие на территории неконтролируемых в установленном порядке объектов кустарного производства пищевой продукции животноводства (особенно — молочных продуктов) и её несанкционированной («неорганизованная») реализации населению, низкий уровень информированности (грамотности) населения о факторах риска по бруцеллёзу, мерах личной профилактики бруцеллёза и борьбы с инфекцией.

Результаты молекулярно-биологического анализа штаммов *B. melitensis*, выделенных от заболевших бруцеллёзом на неблагополучных территориях юга европейской части России, указывают на наличие циркуляции смешанной популяции штаммов бруцелл, в целом характерной для всего субрегиона, но без выраженной приуроченности изолятов к отдельным административным субъектам ЮФО и СКФО. Кроме того, можно разделить выборку на две большие группы клинических изолятов данной территории с различающимися профилями MLVA-16-генотипов по вариабельности локуса *Vncse 19* с числом tandemных повторов 39 (72% выборки) и 41 (28% выборки), позволяющие ассоциировать часть представленной выборки гемокультур с территорией их выделения (РК, РД, СК). Вместе с тем среди рассмотренных длительно неблагополучных по бруцеллёзу административных территорий юга европейской части России можно выделить РК, где в последние 10 лет регистрируется самый вы-

сокий в стране показатель заболеваемости людей бруцеллёзом — 11,54 на 100 тыс. населения (РФ — 0,24, РД — 5,03, СК — 2,63). На территории РК отмечается циркуляция штаммов *B. melitensis* преимущественно одного MLVA-16-генотипа, что может указывать на наличие стойких (не ликвидированных) эпизоотических очагов на этой территории, что также подтверждается выделением от жителей РК на протяжении длительного времени фенотипически и генотипически «однотипных» гемокультур.

Полученные данные позволяют научно обосновать возможность рассматривать длительно неблагополучные территории ЮФО и СКФО как единый (общий), стойкий и длительно активный антропогенный эпизоотический очаг с циркуляцией смешанной, но характерной для региона популяции бруцелл. Для совершенствования эпизоотолого-эпидемиологического мониторинга возбудителей бруцеллёза в России, а также с учётом высокого риска «выноса» (распространения) возбудителя бруцеллёза с эпизоотически неблагополучных территорий ЮФО и СКФО в другие регионы страны необходима паспортизация профиля штаммов возбудителей бруцеллёза региона юга европейской части России.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Wang X.H., Jiang H. Global prevalence of human brucellosis. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2020; 41(10): 1717–22. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112338-20191022-00751> (in Chinese)
2. Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Хачатурова А.А., Скударева О.Н., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л. и др. Анализ эпидемической и эпизоотической ситуации по бруцеллёзу в мире в 2019 г. и прогноз на 2020 г. в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (2): 48–56. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-48-56>
3. Пономаренко Д.Г., Ежлова Е.Б., Русанова Д.В., Хачатурова А.А., Пакскина Н.Д., Бердникова Т.В. и др. Анализ эпизоотолого-эпидемиологической обстановки по бруцеллёзу в Российской Федерации в 2018 г. и прогноз на 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; (2): 14–21. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-2-14-21>
4. Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Бердникова Т.В., Хачатурова А.А., Манин Е.А., Куличенко А.Н. Обзор эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по бруцеллёзу в Российской Федерации в 2017 г. и прогноз на 2018 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; (2): 23–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-2-23-29>
5. Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Русанова Д.В., Вилинская С.В., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллёзу в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (2): 11–3. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-11-13>
6. Намруева Л.В., Иванов Н.П. Тренды, проблемы и перспективы развития животноводства на юге России. *Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 3: Экономика. Экология*. 2018; (1): 55–63. <https://doi.org/10.15688/jvolsu3.2018.1.6>
7. Лямкин Г.И. *Бруцеллёз в регионе Северного Кавказа (эпидемиология, природная очаговость, лабораторная диагностика)*: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. Саратов; 1995.

8. Русанова Д.В. *Эпидемиологические особенности бруцеллёза в Ставропольском крае*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Ставрополь; 2011.
9. Манин Е.А. *Научное обоснование применения ГИС-технологий в эпидемиологическом надзоре за бруцеллёзом (на примере Ставропольского края)*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Ставрополь; 2012.
10. Русанова Д.В., Лямкин Г.И., Головнёва С.И., Вилинская С.В., Манин Е.А. К вопросу изучения антибиотикорезистентности штаммов возбудителя бруцеллеза, выделенных на территории Ставропольского края и Республики Дагестан. В кн.: *Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. Ставрополь; 2012: 63–4.
11. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoëud F., et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a Brucella MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006; 6: 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-9>
12. Ma J.Y., Wang H., Zhang X.F., Xu L.Q., Hu G.Y., Jiang H., et al. MLVA and MLST typing of Brucella from Qinghai, China. *Infect. Dis. Poverty.* 2016; 5: 26. <https://doi.org/10.1186/s40249-016-0123-z>
13. Кулаков Ю.К., Ковалев Д.А., Мисетова Е.Н., Головнева С.И., Ляпустина Л.В., Желудков М.М. Использование multiple locus variable tandem repeats analysis в систематике возбудителя бруцеллеза. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2012; 30(2): 30–4.
14. Электронная база данных MLVA bank for Microbes Genotyping. Available at: <https://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases>
15. R Foundation for Statistical Computing. R: A language and environment for statistical computing. Vienna; 2020. Available at: <https://www.R-project.org/>
16. Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L., François R., et al. Welcome to the Tidyverse. *J. Open Source Softw.* 2019; 4(43): 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
17. Becker R.A., Chambers J.M., Wilks A.R. *The New S Language*. Pacific Grove: Wadsworth & Brooks; 1988.
18. Mardia K.V., Kent J.T., Bibby J.M. *Multivariate Analysis*. London: Academic Press; 1979.
19. Venables W.N., Ripley B.D. *Modern Applied Statistics with S*. New York: Springer-Verlag; 2002.
20. Санникова И.В., Махиня О.В., Малеев В.В., Дейнека Д.А., Голубь О.Г., Ковальчук И.В. и др. Бруцеллёз в Ставропольском крае: результаты 15-летнего наблюдения эпидемиологических и клинических особенностей. *Терапевтический архив.* 2015; 87(11): 11–7. <https://doi.org/10.17116/terarkh2015871111-17>
21. Садикалиева С.О., Строчков В.М., Орынбаев М.Б., Шораева К.А., Еспембетов Б.А., Сансызбай А.Р. и др. Молекулярно-генетическое типирование бактерии рода BRUCELLA, циркулирующих в Республике Казахстан. *Вестник Башкирского университета.* 2017; 22(2): 403–8.
22. epizootiological-epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2018 and forecast for 2019. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2019; (2): 14–21. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-2-14-21> (in Russian)
23. Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Berdnikova T.V., Khachaturova A.A., Manin E.A., Kulichenko A.N. Overview of epizootological and epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2017 and prognosis for 2018. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2018; (2): 23–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-2-23-29> (in Russian)
24. Lyamkin G.I., Ponomarenko D.G., Khudoleev A.A., Rusanova D.V., Vilinskaya S.V., Kulichenko A.N. Review of the epidemiological situation for brucellosis in the Russian Federation in 2015 and forecast for 2016. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2016; (2): 11–3. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-11-13> (in Russian)
25. Namrueva L.V., Ivanov N.P. Trends, problems and prospects for the development of animal husbandry in the south of Russia. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 3: Ekonomika. Ekologiya.* 2018; (1): 55–63. <https://doi.org/10.15688/jvolsu3.2018.1.6> (in Russian)
26. Lyamkin G.I. *Brucellosis in the North Caucasus region (epidemiology, natural focus, laboratory diagnostics)*: Diss. Saratov; 1995. (in Russian)
27. Rusanova D.V. *Epidemiological features of brucellosis in the Stavropol Territory*: Diss. Stavropol'; 2011. (in Russian)
28. Manin E.A. *Scientific substantiation of the use of GIS technologies in epidemiological surveillance of brucellosis (on the example of the Stavropol Territory)*: Diss. Stavropol'; 2012. (in Russian)
29. Rusanova D.V., Lyamkin G.I., Golovneva S.I., Vilinskaya S.V., Manin E.A. On the issue of studying antibiotic resistance of strains of the causative agent of brucellosis isolated in the territories of the Stavropol Territory and the Republic of Dagestan. In: *Actual Problems of Diseases Common to Humans and Animals: Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation [Aktual'nye problemy bolezney, obshchikh dlya cheloveka i zhivotnykh: Materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem.]*. Stavropol'; 2012: 63–4. (in Russian)
30. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoëud F., et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a Brucella MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006; 6: 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-9>
31. Ma J.Y., Wang H., Zhang X.F., Xu L.Q., Hu G.Y., Jiang H., et al. MLVA and MLST typing of Brucella from Qinghai, China. *Infect. Dis. Poverty.* 2016; 5: 26. <https://doi.org/10.1186/s40249-016-0123-z>
32. Kulakov Yu.K., Kovalev D.A., Missetova E.N., Golovneva S.I., Lyapustina L.V., Zheludkov M.M. Use of multiple locus variable number tandem repeats analysis in systematics of the causative agent of brucellosis. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2012; 27(2): 79–84. <https://doi.org/10.3103/S089141681202005X>
33. Electronic database MLVA bank for Microbes Genotyping. Available at: <https://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases>
34. R Foundation for Statistical Computing. R: A language and environment for statistical computing. Vienna; 2020. Available at: <https://www.R-project.org/>
35. Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L., François R., et al. Welcome to the Tidyverse. *J. Open Source Softw.* 2019; 4(43): 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
36. Becker R.A., Chambers J.M., Wilks A.R. *The New S Language*. Pacific Grove: Wadsworth & Brooks; 1988.
37. Mardia K.V., Kent J.T., Bibby J.M. *Multivariate Analysis*. London: Academic Press; 1979.
38. Venables W.N., Ripley B.D. *Modern Applied Statistics with S*. New York: Springer-Verlag; 2002.

20. Sannikova I.V., Makhinya O.V., Maleev V.V., Deyneka D.A., Golub' O.G., Koval'chuk I.V., et al. Brucellosis in the Stavropol Territory: results of 15-year follow-up of epidemiological and clinical features. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2015; 87(11): 11–7. <https://doi.org/10.17116/terarkh2015871111-17> (in Russian)
21. Sadikalieva S.O., Stochkov V.M., Orynbayev M.B., Shorayeva K.A., Espembetov B.A., Sansyzybay A.R., et al. Molecular-genetic typing of bacteria of genus *Brucella* circulated in the Republic of Kazakhstan. *Vestnik Bashkirskogo universiteta*. 2017; 22(2): 403–8. (in Russian)

Информация об авторах

Хачатурова Анна Андреевна[✉] — аспирант, биолог лаб. бруцеллеза Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, bruc26@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7459-7204>

Пономаренко Дмитрий Григорьевич — к.б.н., зав. лаб. бруцеллеза Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0422-6755>

Ковалев Дмитрий Анатольевич — к.х.н., зав. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Германова Анастасия Николаевна — м.н.с. лаб. бруцеллеза Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5036-9517>

Лукашевич Дарья Евгеньевна — лаборант-исследователь лаб. бруцеллеза Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7405-101X>

Русанова Диана Владимировна — к.м.н., зав. научно-производственной лаб. препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2229-6570>

Сердюк Наталия Сергеевна — к.б.н., биолог лаб. «Коллекция патогенных микроорганизмов» Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5350-0111>

Семенко Оксана Валерьевна — м.н.с. лаб. эпидемиологии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6018-3262>

Жилов Андрей Михайлович — н.с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

Катунина Людмила Семеновна — к.б.н., врач-бактериолог лаб. питательных сред Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7051-059X>

Куличенко Александр Николаевич — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 28.07.2021;
принята к публикации 15.11.2021;
опубликована 15.12.2021

Information about the authors

Anna A. Khachaturova[✉] — graduate student, biologist, Brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, bruc26@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7459-7204>

Dmitriy G. Ponomarenko — Cand. Sci. (Biol.), Head, Brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0422-6755>

Dmitriy A. Kovalev — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of biochemistry, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Anastasiya N. Germanova — junior researcher, Brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5036-9517>

Daria E. Lukashovich — research assistant, Brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7405-101X>

Diana V. Rusanova — Cand. Sci. (Med.), Head, Research and production laboratory of drugs for the diagnosis of especially dangerous and other infections, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2229-6570>

Natalia S. Serdiuk — Cand. Sci. (Biol.), biologist, Laboratory "Collection of pathogenic microorganisms", Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5350-0111>

Oksana V. Semenko — junior researcher, Laboratory of epidemiology, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6018-3262>

Andrey M. Zhiron — researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

Liudmila S. Katunina — Cand. Sci. (Biol.), doctor-bacteriologist, Laboratory of nutrient media, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7051-059X>

Alexandr N. Kulichenko — D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding member of RAS, Director, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 28.07.2021;
accepted for publication 15.11.2021;
published 15.12.2021