

4

ИЮЛЬ – АВГУСТ

Том 100
2023

Ж
М
Э
И

ЖУРНАЛ
МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ИММУНОБИОЛОГИИ

ISSN 2686-7613 (Online)
ISSN 0372-9311 (Print)

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

4

JULY – AUGUST

VOLUME 100
2023

УЧРЕДИТЕЛИ:
ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА
ВСЕРОССИЙСКОЕ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО ЭПИДЕМИОЛОГОВ,
МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

Рецензируемый «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» рассматривает актуальные проблемы мировой науки и обеспечивает синтез новейших результатов исследований в области микробиологии, вирусологии, эпидемиологии, вакцинологии, иммунобиологии, профилактики и контроля инфекционных заболеваний. Междисциплинарный подход дает возможность интеграции передовых научных знаний смежных специальностей, широкого видения проблем фундаментальной и прикладной инфектологии, а также комплексного подхода к созданию биомедицинских технологий. К публикации принимаются научные труды российских и зарубежных исследователей, лекции, а также методические материалы и законодательные документы в области сохранения эпидемиологического благополучия населения.

Журнал входит в базу данных SCOPUS и рекомендованный ВАК «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» по специальностям:

1.5.10. Вирусология (медицинские и биологические науки);

1.5.11. Микробиология (медицинские и биологические науки);

3.2.2. Эпидемиология (медицинские и биологические науки);

3.2.7. Аллергология и иммунология (медицинские и биологические науки).

В соответствии с рекомендациями ВАК (письмо ВАК от 06.12.2022 № 02-1198), журнал относится к категории K1 как издание, входящее в базы данных SCOPUS и RSCI.

4

ИЮЛЬ – АВГУСТ

**ТОМ 100
2023**

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых
коммуникаций.

Свидетельство ПИ № ФС77-75442

ISSN 0372-9311 (Print)
ISSN 2686-7613 (Online)

DOI prefix: 10.36233

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.

Контент доступен под лицензией
Commons Attribution International
4.0 CC-BY.

Используется сервис CrossMark для
поддержания контента журнала
в актуальном состоянии и информирования
читателей об изменениях в опубликованных
статьях.

При публикации статьи на русском
и английском языках статья
размещается под одним DOI.
Переводы публикуются на сайте журнала.

**Журнал представлен
в международных базах данных
и информационно-справочных
системах:**
RSCI; RUSMED; SCOPUS; DOAJ; Ulrich's
Periodicals Directory, ROAD; EBSCO
Publishing (на платформе EBSCOhost);
ROAD; HYPERLINK; OPENALEX; FATCAT;
ZEITSCHRIFTEN DATENBANK; CrossRef;
Dimensions.

ПОДПИСКА:
ГК «Урал-пресс», индекс: 71436.
Тел.: +7(343) 262-65-43.
E-mail: info@ural-press.ru.

**Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах:**
<https://microbiol.crie.ru>;
<https://www.elibrary.ru>;
<https://www.cyberleninka.ru>;
<https://www.rucont.ru>;
<https://www.ebsco.com>;
<https://www.doaj.org>;
<http://www.elsevier.com>

УЧРЕДИТЕЛИ:
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
www.crie.ru

Всероссийское научно-практическое
общество эпидемиологов,
микробиологов и паразитологов

ИЗДАТЕЛЬ:
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

111123, Москва, ул. Новогиревская, д. 3А.
Тел.: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pcr.ru

*Начальник редакционно-
издательского отдела:*
Осокина Ольга Владимировна

РЕДАКЦИЯ:
111123, Москва, ул. Новогиревская, д. 3А.
Тел.: +7(925)011-87-79.
E-mail: jmei@crie.ru

Заведующая редакцией:
Устинкова Ольга Владимировна

Журнал размещает рекламу в соответствии
с ФЗ РФ от 13.03.2006 № 38-ФЗ
«О рекламе» и рекламной политикой.

К публикации принимаются только статьи,
подготовленные в соответствии с правилами
для авторов (<https://microbiol.crie.ru>).

Направляя статью в редакцию, авторы
принимают условия договора публичной
оферты (<https://microbiol.crie.ru>).

Подписано в печать 28.08.2023.
Формат 60×90^{1/8}. Тираж 158 экз.
Усл.-печ. л. 15,5.

Отпечатано в «Объединенный
полиграфический комплекс».
115114, Москва, Дербеневская
набережная, 7с2.
E-mail: info@opk.bz www.opk.bz

16+

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2023

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Зверев В.В., д.б.н., проф., acad. РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии,
иммунологии, Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Заместитель главного редактора

Семенов Т.А., д.м.н., проф., руководитель отдела эпидемиологии ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Ответственные секретари

Платонов А.Е., д.м.н., проф., главный научный сотрудник лабораторией эпидемиологии природно-очаговых
инфекций, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия
Мионов К.О., д.м.н., зав. лаб. молекулярных методов изучения генетических полиморфизмов ФБУН ЦНИИ
Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

Акимкин В.Г., д.м.н., проф., acad. РАН, директор
ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва,
Россия
Брико Н.И., д.м.н., проф., acad. РАН, директор Института
общественного здоровья, зав. кафедрой эпидемиологии
и доказательной медицины, Первый Московский
государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва,
Россия
Брусина Е.Б., д.м.н., проф., член-корр. РАН,
зав. кафедрой эпидемиологии, Кемеровский
государственный медицинский университет, Кемерово,
Россия
Бухарин О.В., д.м.н., проф., acad. РАН, научный
руководитель Института клеточного и внутриклеточного
симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия
Гинцбург А.Л., д.б.н., проф., acad. РАН, директор ФНИЦ
эпидемиологии и микробиологии имени почетного
академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва,
Россия
Горелов А.В., д.м.н., проф., acad. РАН, зам.
директора по научной работе ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора, Москва, Россия
Жирнов О.П., д.б.н., проф., член-корр. РАН, зав. лабора-
торией вирусного патогенеза Института вирусологии
им. Д.И. Иванова, ФНИЦ эпидемиологии и микробио-
логии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи
Минздрава России, Москва, Россия
Караулов А.В., д.м.н., проф., acad. РАН, зав. кафедрой
клинической иммунологии и аллергологии Института
клинической медицины, Первый Московский государ-
ственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет), Москва, Россия
Козлов Р.С., д.м.н., проф., член-корр. РАН, ректор,
Смоленский государственный медицинский
университет, Смоленск, Россия
Куличенко А.Н., д.м.н., проф., acad. РАН,
директор Ставропольского научно-исследовательского
противочумного института Роспотребнадзора,
Ставрополь, Россия
Кутырев В.В., д.м.н., проф., acad. РАН, директор,
Российский научно-исследовательский институт
«Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия
Лобзин Ю.В., д.м.н., проф., acad. РАН, директор,
Детский научно-клинический центр инфекционных
болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

Иностранные члены редакционной коллегии

Alexander V. Bocharov, MD, PhD (Medicine), Staff
scientist, Department of Laboratory Chemistry, Clinical
Center, National Institutes of Health, Bethesda, USA
Shubhada Vopengamagae, PhD, MSc, Professor, Institute
of Microbiology, Slovak Medical University, Bratislava,
Slovak Republic
Michael O. Favorov, PhD, D.Sci. (Medicine), President,
DiaPrep System Inc., Atlanta, GA, United States;
Chief Scientific Officer, Turklab, Turkey
Elena A. Govorkova, MD, PhD, St. Jude Children's
Research Hospital, Memphis, USA
Helmut Hahn, MD, PhD, Professor, Vice-president
of the European Academy of Natural Sciences, President
of the R. Koch Medical Society (Germany), Chairman of
German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Дьяков И.Н., к.б.н., заведующий лабораторией
биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ НИИВС
им. И.И. Мечникова, Москва, Россия
Кюрегян К.К., д.б.н., проф., заведующий лабораторией
молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ЦНИИ
Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия
Макарова М.А., д.м.н., старший научный сотрудник
Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробио-
логии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Лукашев А.Н., д.м.н., проф., член-корр. РАН, директор
Института медицинской паразитологии, тропических и
трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского,
Первый Московский государственный медицинский уни-
верситет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет),
Москва, Россия
Максютов Р.А., д.б.н., генеральный директор,
ГНЦ вирусологии и биотехнологии (Вектор)
Роспотребнадзора, Новосибирск, Россия
Малеев В.В., д.м.н., проф., acad. РАН, советник
директора, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора,
Москва, Россия
Михайлов М.И., д.м.н., проф., член-корр. РАН, зав. ла-
бораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток
им. И.И. Мечникова, Москва, проф. кафедры эпидемио-
логии Белгородского государственного университета,
Белгород, Россия
Несвижский Ю.В., д.м.н., проф., проф. кафедры
микробиологии, вирусологии и иммунологии
им. А.А. Воробьева, Первый Московский государствен-
ный медицинский университет им. И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет), Москва, Россия
Онищенко Г.Г., д.м.н., проф., acad. РАН, зав. кафедрой
экологии человека и гигиены окружающей среды,
Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский
Университет), Москва, Россия
Свитич О.А., д.м.н., член-корр. РАН, директор,
НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва,
Россия
Тартаковский И.С., д.б.н., проф., зав. лабораторией
легионеллеза, ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава
России, Москва, Россия
Тотолян А.А., д.м.н., проф., acad. РАН, директор,
Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург,
Россия
Черкасов С.В., д.м.н., проф., член-корр. РАН,
директор, Оренбургский федеральный
исследовательский центр Уральского отделения РАН,
Оренбург, Россия
Шаркова В.А., д.м.н., проф., зав. кафедрой микробио-
логии и вирусологии, Тихоокеанский государственный
медицинский университет, Владивосток, Россия
Werner Lubitz, MSc, PhD, Professor, VP R&D, Founder,
Biotech Innovation Research Development & Consulting,
Vienna, Austria
Bogdan N. Petrunov, MD, DSc, Professor, Academic
of the Bulgarian Academy of Sciences, National Center
of Infectious and Parasitic Diseases, President
of the Medical Section of the Bulgarian Academy
of Sciences, Sofia, Bulgaria
Georgy S. Nikolov, MD, PhD, Associate Professor,
National Center of Infectious and Parasitic Diseases,
Sofia, Bulgaria
Murad Giyas oglu Mammadov, MD, DSc, Professor,
National Oncology Center of the Ministry of Health
of the Republic of Azerbaijan, Baku,
Republic of Azerbaijan

Мескина Е.Р., д.м.н., зав. отделением детских инфекций
отдела терапии, ГБУЗ МО «Московский областной
научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия
Никонова А.А., к.б.н., зав. лаб. молекулярной
биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский
институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»,
Москва, Россия

FOUNDERS:
Central Research Institute for Epidemiology
Russian Scientific Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists

JOURNAL of MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY

(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Bimonthly scientific and practical journal

Founded in 1924

Peer-reviewed Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology is dedicated to the most significant issues of world science and provides a synthesis of the cutting edge research in the field of microbiology, virology, epidemiology, vaccinology, immunobiology, prevention of infectious diseases.

The interdisciplinary approach enables the reader to integrate advanced scientific knowledge of related specialties, to receive a broad vision of the problems of fundamental and applied infectology and a comprehensive approach to creating innovative biomedical technologies.

The Journal welcomes Russian and foreign original research articles, reviews, brief reports, mini-reviews, opinions and other special featured articles as well as lectures, methodological materials related to its profile.

The Journal is indexed in the SCOPUS database and admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science:

1.5.10. Virology (medical and biological sciences);

1.5.11. Microbiology (medical and biological sciences);

3.2.2. Epidemiology (medical and biological sciences);

3.2.7. Clinical immunology, Allergology (medical and sciences).

In accordance with the recommendations of the Higher Attestation Commission (letter of the Higher Attestation Commission dated December 06, 2022 No. 02-1198), the Journal belongs to the K1 category, as a publication included in the SCOPUS and RSCI databases.

4

JULY–AUGUST

VOLUME 100

2023

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration PI no. FS77-75442

ISSN 0372-9311 (Print)
ISSN 2686-7613 (Online)

DOI prefix: 10.36233

The journal is an Platinum Open Access peer-reviewed scholarly journal, which does not charge author fees.

The content is licensed under Commons Attribution International 4.0 CC-BY.

The CrossMark service is used.

Some articles are translated into English under the decision of the Editorial Board. When publishing an article in Russian and English, the translated article is placed under the same DOI on the Journal's website.

The Journal is indexed by the following abstracting and indexing services:

RSCI; RUSMED; SCOPUS; DOAJ; Ulrich's Periodicals Directory, ROAD; EBSCO Publishing (на платформе EBSCOhost); ROAD; HYPERLINK; OPENALEX; FATCAT; ZEITSCHRIFTEN DATENBANK; CrossRef; Dimensions.

Index for subscription to the printed version of the journal:

Ural Press: 71436.
Tel.: +7(343) 262-65-43.
E-mail: info@ural-press.ru.

Full texts of issues of the journal are available:

<https://microbiol.crie.ru/>;
<https://www.elibrary.ru/>;
<https://www.cyberleninka.ru/>;
<https://www.rucont.ru/>;
<https://www.ebsco.com/>;
<https://www.doaj.org/>;
<http://www.elsevier.com>

FOUNDERS:

Central Research Institute for Epidemiology; Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists

PUBLISHER:

Central Research Institute for Epidemiology, 111123, 3A, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pcr.ru

EDITORIAL OFFICE:

5A, Maly Kazenny per., Moscow, 105064, Russia.
Tel.: +7(925)011-87-79.
E-mail: jmel@crie.ru

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (<https://microbiol.crie.ru>) are rejected without further consideration.

When the author submits an article to the Editorial Board, he/she accepts the terms and conditions of the public offer agreement (<https://microbiol.crie.ru>).

Signed to the press on August 28, 2023.

Print format 60×90^{1/8}.

Circulation 158 copies.

Printed at the Ob'yedinennyy poligraficheskiy kompleks Ltd.115114, 7C2, Derbenevskaya emb., Moscow, Russian Federation.

E-mail: info@opk.bz. www.opk.bz

EDITOR-IN-CHIEF

Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biology), RAS Full Member, Professor, Head, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Deputy Editor

Tatiana A. Semenenko, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Epidemiology Department, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Executive Secretaries

Alexander E. Platonov, Professor, Dr. Sci. (Medicine), chief researcher, Laboratory of Zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Konstantin O. Mironov, Dr. Sci. (Medicine), Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

Vasily G. Akimkin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Nikolay I. Briko, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Institute of Public Health, Head, Department of Epidemiology and Evidence-Based Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Elena B. Brusina, professor, Dr. Sci. (Medicine), RAS Corr. Member, Head, Department of epidemiology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Oleg V. Bukharin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Scientific Director of the Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Academy of Sciences, Orenburg, Russia

Aleksandr L. Gintsburg, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology), Director, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Alexandr V. Gorelov, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Deputy Director for Scientific Research, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Oleg P. Zhironov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology), Head, Laboratory of viral pathogenesis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Alexander V. Karaulov, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Alexander N. Kulichenko, D. Sci. (Medicine), Professor, RAS Full Member, Director of the Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia

Roman S. Kozlov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Rector, Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia

Vladimir V. Kutryev, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia

Yuri V. Lobzin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia

Foreign members of the Editorial Board

Alexander V. Bocharov, MD, PhD (Medicine), Staff scientist, Department of Laboratory Chemistry, Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, USA

Shubhada Bopemage, PhD, MSc, Professor, Institute of Microbiology, Slovak Medical University, Bratislava, Slovak Republic

Michael O. Favorov, PhD, DSc (Medicine), President, DiaPrep System Inc., Atlanta, GA, United States; Chief Scientific Officer, Turklab, Turkey

Elena A. Govorkova, MD, PhD, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA

Helmut Hahn, MD, PhD, Professor, Vice-president of the European Academy of Natural Sciences, President of the R. Koch Medical Society (Germany), Chairman of German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

EDITORIAL COUNCIL

Ilya N. Dyakov, Cand. Sci. (Biology), Head, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Karen K. Kyuregyan, Dr. Sci. (Biology), Professor, Head, Laboratory of molecular epidemiology of viral hepatitis Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Maria A. Makarova, Dr. Sci. (Medicine), senior researcher, Laboratory for Identification of Pathogens, Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Alexander N. Lukashev, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Rinat A. Maksyutov, Dr. Sci. (Biology), Director General, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk, Russia

Victor V. Maleev, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director adviser, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Mikhail I. Mikhaylov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Laboratory of viral hepatitis, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Professor, Department of epidemiology, Belgorod State University, Medical Institute, Belgorod, Russia

Gennadiy G. Onishchenko, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Human Ecology and Environmental Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Yury V. Nesvizhsky, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, Russia

Oxana A. Svitich, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Valentina A. Sharkova, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Microbiology and Virology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Igor S. Tartakovskiy, Professor, Dr. Sci. (Biology), Head, Laboratory of legionellosis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Areg A. Totolian, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Sergey V. Cherkasov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia

Werner Lubitz, MSc, PhD, Professor, VP R&D, Founder, Biotech Innovation Research Development and Consulting, Vienna, Austria

Bogdan N. Petrunov, MD, DSc, Professor, Academic of the Bulgarian Academy of Sciences, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, President of the Medical Section of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Georgiy S. Nikolov, MD, PhD, Associate Professor, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

Murad Giyas oglu Mammadov, MD, DSc, Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

Elena R. Meskina, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Pediatric Infections, Department of Therapy, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

Alexandra A. Nikonova, Cand. Sci. (Biology), Head, laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гущин В.А., Почтовый А.А., Кустова Д.Д., Огаркова Д.А., Клейменов Д.А., Семенов Т.А., Логунов Д.Ю., Злобин В.И., Гинцбург А.Л. Характеристика эпидемического процесса COVID-19 в Москве и поиск возможных факторов, определяющих тенденции наблюдаемых изменений.....	267
Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Воропаев А.Д., Урбан Ю.Н., Сулейманова М.Э., Афанасьев М.С., Буданова Е.В., Воропаева Е.А. Спектр и функциональные свойства мутаций гена <i>ERG11</i> флуконазол-резистентных грибов <i>Candida albicans</i> , выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов*	285
Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Клюева С.Н., Шмелькова Т.П., Кожевников В.А. Оценка изменений фенотипа, интенсивности дегрануляции, гибели и лизиса нейтрофилов при моделировании <i>ex vivo</i> стафилококковой бактериемии	293
Быков Р.О., Скрыбина С.В., Клячина А.С., Итани Т.М., Чалапа В.И., Старикова П.К., Колтунов С.В., Пономарева А.В., Семенов А.В. Молекулярно-генетическая характеристика и филогенетический анализ возбудителей норовирусной инфекции человека отдельных муниципалитетов в Свердловской области за 2022 год	306
Sutriyawan A., Manap A., Sulami N., Setiyadi A., Mariza Riskiah D., Kurniawati Ratna D., Khariri K. Analysis of entomological indicators and distribution of <i>Aedes aegypti</i> larvae in dengue endemic areas	314
Новикова И.Е., Садеева З.З., Алябьева Н.М., Самойлова Е.А., Карасева О.В., Янюшкина О.Г., Лазарева А.В. Антибиотикорезистентность и вирулентность карбапенем-устойчивых штаммов <i>Klebsiella pneumoniae</i> , выделенных у детей в реанимационных и хирургических отделениях	321
ОБЗОРЫ	
Макарова М.А. Современное представление о диареогенных <i>Escherichia coli</i> — возбудителях острых кишечных инфекций*	333
Сорокина Ю.В., Белый Ю.Ф. Система секреции 4-го типа у <i>Clostridioides difficile</i> : структурные особенности и её роль как фактора патогенности*	345
Савкина М.В., Саяпина Л.В., Кривых М.А., Обухов Ю.И. Перспективные фармацевтические разработки вакцин для профилактики менингококковой инфекции.....	354
Ташланова В.В., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф. Видовая характеристика бактерий рода <i>Lactobacillus</i> , циркулирующих в различных локусах организма человека (обзор литературы)	364
ЮБИЛЕИ	
100 лет с именем Пастера	376
К 70-летию члена-корреспондента РАН Михаила Ивановича Михайлова	379
ИНФОРМАЦИЯ	
Объявление о Юбилейной конференции, посвященной 60-летию Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии «Эпидемиология и инфекционные болезни: связь времен и поколений»	381

* Статья опубликована на русском и английском языках на сайте журнала: <https://www.microbiol.crie.ru>.

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Gushchin V.A., Pochtovyi A.A., Kustova D.D., Ogarkova D.A., Kleymenov D.A., Semenenko T.A., Logunov D.Yu., Zlobin V.I., Gintsburg A.L. Characterisation of the COVID-19 epidemic process in Moscow and search for possible determinants of the trends of the observed changes	267
Nesvizhsky Yu.V., Afanasiev S.S., Voropaev A.D., Urban Yu.N., Suleymanova M.E., Afanasiev M.S., Budanova E.V., Voropaeva E.A. Spectrum and functional properties of <i>ERG11</i> gene mutations in fluconazole-resistant <i>Candida albicans</i> strains isolated from HIV-infected patients*	285
Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Shmelkova T.P., Kozhevnikov V.A. Assessment of changes in the phenotype, intensity of degranulation, death and lysis of neutrophils in <i>ex vivo</i> modeling of <i>Staphylococcal</i> bacteremia	293
Bykov R.O., Scriabina S.V., Kilyachina A.S., Itani T.M., Chalapa V.I., Starikova P.K., Koltunov S.V., Ponomareva A.V., Semenov A.V. Genetic characterization and phylogenetic analysis of human norovirus infection in individual municipalities of the Sverdlovsk region in 2022.....	306
Sutriyawan A., Manap A., Sulami N., Setiyadi A., Mariza Riskiah D., Kurniawati Ratna D., Khariri K. Analysis of entomological indicators and distribution of <i>Aedes aegypti</i> larvae in dengue endemic areas	314
Novikova I.E., Sadeeva Z.Z., Alyabieva N.M., Samoylova E.A., Karaseva O.V., Yanyushkina O.G., Lazareva A.V. Antimicrobial resistance and virulence of carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains isolated from children in intensive care and surgical units	321
REVIEWS	
Makarova M.A. A modern view of diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> — a causative agent of acute intestinal infections*	333
Sorokina Yu.V., Belyi Yu.F. Type 4 secretion system in <i>Clostridioides difficile</i> : Structural features and its role as a pathogenicity factor*	345
Savkina M.V., Sayapina L.V., Krivykh M.A., Obukhov Yu.I. Promising pharmaceutical development of vaccines for the prevention of meningococcal infection	354
Tashlanova V.V., Kataeva L.V., Stepanova T.F. Species characteristics of bacteria of the genus <i>Lactobacillus</i> identified in different loci of the human body (literature review).....	364
ANNIVERSARIES	
100 years with the name of Pasteur	376
On the occasion of the 70 th anniversary of the corresponding member of the Russian Academy of Sciences Mikhail Ivanovich Mikhailov	379
INFORMATION	
Announcement of the Anniversary Conference dedicated to the 60 th anniversary of the Central Research Institute of Epidemiology "Epidemiology and infectious diseases: connection of times and generations"	381



Характеристика эпидемического процесса COVID-19 в Москве и поиск возможных факторов, определяющих тенденции наблюдаемых изменений

Гущин В.А.^{1,2}, Почтовый А.А.^{1✉}, Кустова Д.Д.^{1,2}, Огаркова Д.А.¹, Клейменов Д.А.¹, Семенов Т.А.¹, Логунов Д.Ю.¹, Злобин В.И.¹, Гинцбург А.Л.^{1,3}

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Аннотация

Введение. Постоянная оценка динамики основных характеристик эпидемического процесса является базовой функцией эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями. Поиск факторов, определяющих изменения характеристик эпидемического процесса, позволяет своевременно вырабатывать управленческие решения и снижать риск увеличения масштабов пандемии. Москва является основным центром притяжения населения других регионов России с наиболее сложной структурой социальных связей и самой высокой плотностью населения.

Цель и задачи исследования — выявить факторы, потенциально определяющие тенденции наблюдаемых изменений, с помощью молекулярно-эпидемиологического анализа основных характеристик эпидемического процесса новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

Материалы и методы. Для проведения анализа данные Российской национальной базы геномных последовательностей вируса SARS-CoV-2 (VGARus) были объединены с информацией о заболеваемости и смертности, представленными на официальных интернет-ресурсах стопкоронавирус.рф и Yandex DataLens, о динамике вакцинации, перенесённом заболевании COVID-19 и госпитализации с портала Gogov.ru. Для изучения половой и возрастной структуры госпитализированных пациентов проведено многоцентровое ретроспективное наблюдательное эпидемиологическое исследование. Источником данных для анализа половозрастной структуры послужили истории болезни пациентов с COVID-19, собранные в различные периоды наблюдения на базе учреждений города Москвы (41 561 наблюдение).

Результаты. Выделено 11 периодов, достоверно различающихся по комплексу эпидемиологических характеристик. Выявлено снижение заболеваемости среди молодых людей трудоспособного возраста во время действия ограничительных мероприятий. В 3 из 11 периодов ухудшение эпидемической ситуации совпало с началом циркуляции нового генетического варианта возбудителя COVID-19 (варианты Ухань, Дельта, Омикрон). Отмечено снижение заболеваемости в летний период вне зависимости от циркулирующих генетических вариантов.

Заключение. Существенная часть наблюдаемой динамики характеристик эпидемического процесса в Москве может объясняться свойствами возбудителя, сезонностью и динамикой напряжённости иммунитета. Влияние динамики показателей напряжённости коллективного иммунитета на ход эпидемического процесса предстоит изучить дополнительно.

Ключевые слова: эпидемический процесс, COVID-19, заболеваемость, смертность, Москва, SARS-CoV-2, генетические линии, Ухань, Дельта, Омикрон

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Национального научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 14 от 29.09.2021).

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения РФ в рамках реализации Государственного задания №123031400022-0 «Изучение изменчивости SARS-CoV-2 в контексте биологических рисков снижения эффективности применяемых средств терапии и профилактики в ходе пандемии COVID-19».

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

Для цитирования: Гущин В.А., Почтовый А.А., Кустова Д.Д., Огаркова Д.А., Клейменов Д.А., Семенов Т.А., Логунов Д.Ю., Злобин В.И., Гинцбург А.Л. Характеристика эпидемического процесса COVID-19 в Москве и поиск возможных факторов, определяющих тенденции наблюдаемых изменений. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):267–284. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-375>
EDN: <https://www.elibrary.ru/pvnhvz>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-375>

Characterisation of the COVID-19 epidemic process in Moscow and search for possible determinants of the trends of the observed changes

Vladimir A. Gushchin^{1,2}, Andrei A. Pochtovyi^{1✉}, Daria D. Kustova^{1,2}, Darya A. Ogarkova¹, Denis A. Kleymenov¹, Tatiana A. Semenenko¹, Denis Yu. Logunov¹, Vladimir I. Zlobin¹, Alexander L. Gintsburg^{1,3}

¹National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract

Background. Constant assessment of the dynamics of the main characteristics of the epidemic process is the basic function of epidemiological surveillance of infectious diseases. The search for factors that determine changes in the characteristics of the epidemic process makes it possible to develop timely management decisions and reduce the risk of an increase in the scale of the pandemic. Moscow is the main centre of attraction for the population of other Russian regions with the most complex structure of social links and the highest population density.

The purpose of the study is to identify factors that potentially determine the trends of observed changes using a molecular epidemiological analysis of the main characteristics of the epidemic process of a new coronavirus infection (COVID-19).

Materials and methods. For the analysis, the data of Russian national genome sequence database of SARS-CoV-2 virus (VGARus) were combined with information on morbidity and mortality presented at the official internet resources “стопкоронавирус.рф” and Yandex DataLens, the dynamics of vaccination, COVID-19 disease incidence and hospitalization from the portal Gogov.ru. A multicentre retrospective observational epidemiological study was conducted to examine the sex and age structure of hospitalised patients. Anonymized case histories of patients with COVID-19 collected at different follow-up periods in the institutions of Moscow (41,561 cases) served as a source of data for the sex and age structure analysis.

Results. We identified 11 periods with significantly different complex epidemiological characteristics. A decrease in the incidence among young people of working age during the period of restrictive measures was revealed. In 3 out of 11 worsening of the epidemic situation coincided with the beginning of the circulation of a new genetic variant of the pathogen COVID-19 (variants Wuhan, Delta, Omicron). A decrease in the incidence in the summer period was noted, regardless of the circulating genetic variants.

Conclusion. A significant part of the observed dynamics of the characteristics of the epidemic process in Moscow can be explained by the properties of the pathogen, seasonality and dynamics of magnitude of the herd immunity. The influence of the dynamics of the herd immunity indicators on the course of the epidemic process is to be studied further.

Keywords: epidemic process, COVID-19, morbidity, mortality, Moscow, SARS-CoV-2, genetic lineages, Wuhan, Delta, Omicron

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya (protocol No. 14, September 29, 2021).

Funding source. The study was funded by the Ministry of Health of the Russian Federation (Project No. 123031400022-0, titled "Investigation of SARS-CoV-2 variability in relation to the biological risks associated with the reduced efficacy of therapy and prevention used during the COVID-19 pandemic").

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

For citation: Gushchin V.A., Pochtovyi A.A., Kustova D.D., Ogarkova D.A., Kleymenov D.A., Semenenko T.A., Logunov D.Yu., Zlobin V.I., Gintsburg A.L. Characterisation of the COVID-19 epidemic process in Moscow and search for possible determinants of the trends of the observed changes. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(4):267–284. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-375>. EDN: <https://www.eLibrary.ru/pvnhvz>

Введение

За неполных 3 года пандемии в России было зарегистрировано более 21 млн случаев COVID-19, из которых более 381 тыс. окончились летальным исходом¹. Таким образом, общая летальность составила порядка 1,8%. Россия находится в числе стран с наиболее высокими показателями заболеваемости и смертности, что подчёркивает важность поиска факторов, определяющих ухудшение эпидемической ситуации по COVID-19 на её территории. Отечественными эпидемиологами проведены исследования, позволяющие оценить характеристики эпидемического процесса COVID-19 в России, его закономерности и территориальные особенности. В.Г. Акимкиным и соавт. был сделан такой анализ с использованием всех основных источников эпидемиологически значимой информации и выделены пять основных волн заболеваемости COVID-19 в России, произошедших за первые 2 года пандемии [1]. Средняя заболеваемость по периодам составила 30,72, 73,92, 85,89, 141,28 и 442,31‰ в 1–5-м периодах соответственно. Интересно, что в Москве показатель заболеваемости, зафиксированный в первый период, превышал общероссийский в 6,4 раза. В целом в регионах России, по сравнению с Москвой, фиксировались запаздывающий характер роста заболеваемости и более смазанные пики, не достигающие значений, характерных для столицы. Авторы выделяют среди заболевших преобладание женщин и мужчин старше 50 лет. Наименьший удельный вес в структуре заболеваемости отмечен среди лиц в возрасте 18–29 лет с преобладанием в этой группе бессимптомных форм инфекции [2].

Данные клинико-эпидемиологических особенностей пациентов, госпитализированных с COVID-19 в различные периоды пандемии в Москве, представлены в работе Н.И. Брико и соавт. [3]. Для анализа авторы использовали информацию сайта стопкоронавирус.рф, оперативного штаба и собранную на базе двух столичных стационаров, включая Инфекционную клиническую больницу № 2 ДЗМ и Городскую клиническую больницу № 40 ДЗМ (подразделение в Коммунарке) в период с марта 2020 г. по март 2022 г. (всего 34 148 пациентов). Авторы выделили 7 близких по эпидемиологическим характеристикам периодов динамики заболеваемости COVID-19 в Москве, включая не только периоды подъёма заболеваемости, но и периоды стабилизации между периодами роста. Границы периодов определены на основании рассчитанных уровней заболеваемости, смертности, её темпов и скорости прироста/снижения. В результате проведённого исследования установлено, что

заболеваемость по периодам составила 111,9, 38,0, 247,3, 120,2, 230,4, 210,4 и 1316,8‰ в 1–7-м периодах соответственно. Средний возраст госпитализированных пациентов за всё время наблюдения в Москве оценивается в 53 года. Гендерный состав пациентов: 55,8% — женщины, 44,2% — мужчины.

В более поздних исследованиях в период пандемии COVID-19 в России приводится анализ заболеваемости и динамики циркуляции генетических вариантов вируса SARS-CoV-2 [4]. Отмечается, что при появлении новых генетических вариантов возбудитель становится менее патогенным для человека, но более контагиозным. Доказательством этого, по мнению авторов, служат показатели динамики проявлений эпидемического процесса и тяжести течения заболевания. При этом данные по накоплению доли иммунных лиц и их роли в изменении динамики заболеваемости и тяжести течения COVID-19 не анализируются. Авторы отмечают, что в настоящее время молекулярно-генетический мониторинг циркуляции SARS-CoV-2 является ведущим направлением эпидемиологического надзора за COVID-19, позволяющим принимать решения по разработке и осуществлению противоэпидемических мероприятий. Учитывая, что Москва является крупнейшим мегаполисом России, в котором эпидемический процесс COVID-19 идёт с некоторым опережением и в наиболее активной форме, нами предпринята попытка проведения эпидемиологического анализа с использованием результатов молекулярно-генетического мониторинга с целью выявления основных факторов, определявших тенденции наблюдаемых изменений основных характеристик эпидемического процесса COVID-19 в 2020–2022 гг.

Материалы и методы

Выполнено описательное сплошное исследование, основным методом которого являлся ретроспективный эпидемиологический анализ, а также статистические методы. Динамику проявлений эпидемического процесса COVID-19 в Москве анализировали за период с марта 2020 г. по октябрь 2022 г. Данные о заболеваемости и смертности были получены с официального интернет-ресурса для информирования населения по вопросам COVID-19 стопкоронавирус.рф и Yandex DataLens, о динамике вакцинации, перенесённом заболевании COVID-19 и госпитализации — с портала Gogov.ru. Всего было проанализировано 3 216 457 случаев заболеваний, 724 284 случая госпитализации и 46 338 случаев смерти, обусловленных COVID-19. Выбранный временной отрезок был разделён на периоды динамики заболеваемости, смертности и госпитализации с COVID-19 в Москве. Их границы были определены на основании рассчитанных уровней заболеваемости — были выделены периоды роста и снижения, а также периоды стабилизации уровней заболеваемости

¹ JHU.edu. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). URL: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>

мости (всего 11 периодов). Для полученного временного ряда рассчитывали средние значения ряда и ежемесячный темп прироста показателей. Выравнивание ряда проводили методом наименьших квадратов. График содержал динамику показателя, линию тенденции (теоретическая заболеваемость), доверительные границы теоретических показателей (95% доверительный интервал) для оценки тенденции, доверительные границы фактических показателей (95% доверительный интервал) в годы максимального подъёма и предыдущего спада заболеваемости для оценки выраженности колебаний показателей заболеваемости.

Проведённое нами ретроспективное описательное эпидемиологическое исследование включало анализ динамики показателей в целом, а также каждого из выделенных нами периодов с использованием общего количества заболеваний, госпитализаций и смертей за весь период и параметрического описания (среднее и 95% доверительный интервал) с последующей оценкой значимости различий в показателях заболеваемости, госпитализаций и смертности между каждыми двумя периодами с использованием критерия Геймса–Хоуэлла (не требует равенства дисперсий). Данный критерий используется для выявления групп, между которыми есть различия средних значений, как апостериорный после дисперсионного анализа. Использование данного критерия позволяет снизить вероятность отклонения нулевой гипотезы при том, что она верна. Значимость различий по наиболее характерным временным отрезкам внутри периода, включавшего 14 дней, определяли с использованием критерия χ^2 Пирсона с поправкой на множественность Бонферрони.

Для анализа половозрастной структуры заболевших COVID-19 использовали истории болезни пациентов, давших информированное согласие, составленные в различные периоды наблюдения на базе медицинских учреждений Москвы: Инфекционной клинической больницы № 1 ДЗМ, Городской клинической больницы № 67 ДЗМ. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Национального научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 14 от 29.09.2021).

Выборочный молекулярно-генетический мониторинг осуществлён на базе медицинских учреждений ДЗМ, из Российской национальной базы данных геномных последовательностей вируса SARS-CoV-2 VGARus получены сведения за период с марта 2020 г. по октябрь 2022 г. В исследование вошли пациенты от 0 до 104 лет с подтверждённым диагнозом COVID-19. Общий размер сформированной выборки составил 41 561 пациента. Статисти-

чески значимые различия между периодами по половому составу были рассчитаны с использованием критерия χ^2 Пирсона.

Статистически достоверными различия признавали при значении $p < 0,05$.

Результаты

Общая характеристика эпидемического процесса COVID-19 в Москве

Для оценки эпидемического процесса в Москве и выявления причинных факторов, обуславливающих его волнообразный характер, нами был использован временной интервал с марта 2020 г. по октябрь 2022 г. В рамках указанного интервала первой задачей было определение отличающихся по эпидемиологическим характеристикам периодов на основании данных о заболеваемости и госпитализации и смертности.

В указанный период можно выделить 6 классических циклов подъёма и спада заболеваемости, госпитализации и смертности (**рис. 1**), хотя полного прекращения циркуляции вируса между периодами не наблюдалось. Для углублённого изучения причин волнообразности выбранный временной отрезок был разделён нами на 11 периодов с учётом значений заболеваемости COVID-19 непосредственно граничащих между собой периодов с использованием критерия Геймса–Хоуэлла (не требует равенства дисперсий). Границы периодов позволили отделить периоды роста и снижения заболеваемости от периодов относительного благополучия и стабилизации и учитывали смену тенденции динамики заболеваемости. Отличие от ранее выделенных 6 периодов [3] заключается во включении двух дополнительных периодов снижения и роста заболеваемости в 2022 г., а также выделения всех межпиковых временных отрезков в самостоятельные периоды. Для каждого из выделенных нами периодов была проведена статистическая обработка достоверности отличий в показателях заболеваемости, госпитализаций и смертности по всему периоду с использованием критерия Геймса–Хоуэлла, а также по наиболее контрастным во временном отрезке внутри периода, включавшем фиксированный 14-дневный интервал с использованием критерия χ^2 (**таблица**).

По уровню заболеваемости непосредственно граничащие между собой периоды достоверно отличались по обоим критериям. По смертности все периоды отличались друг от друга по критерию Геймса–Хоуэлла, тогда как по χ^2 — все, кроме периодов 7–9. По количеству госпитализированных, наоборот, все периоды отличались по критерию χ^2 , тогда как по критерию Геймса–Хоуэлла не отличались периоды 8 и 9. Таким образом было подтверждено, что границы, определённые нами для дальнейшего анализа, действительно позволяют

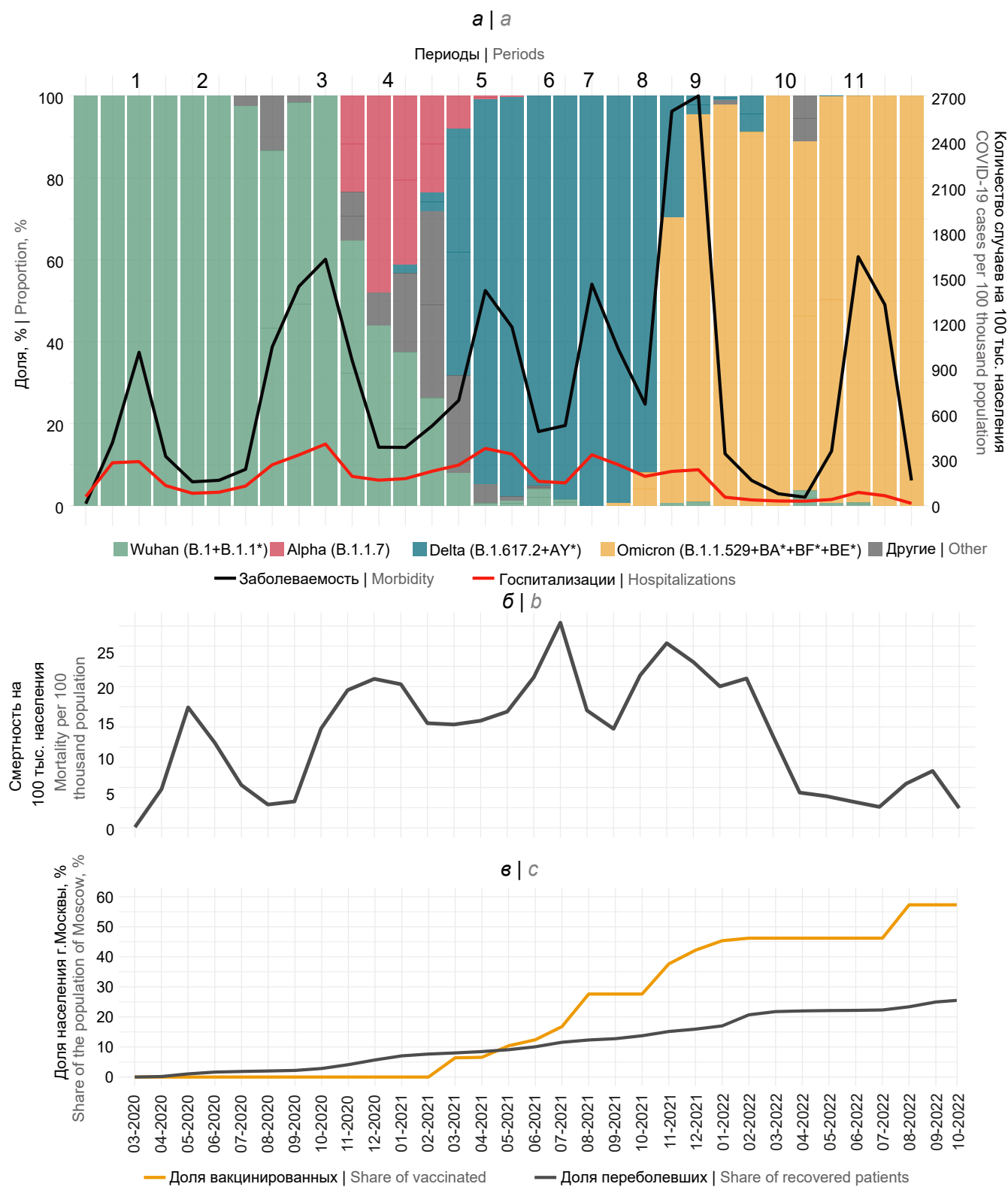


Рис. 1. Динамика основных показателей эпидемического процесса COVID-19 в Москве в периоды доминирования основных генетических вариантов возбудителя по месяцам.

а — доминирующие генетические варианты вируса SARS-CoV-2, заболеваемость и госпитализация; **б** — динамика смертности; **в** — динамика вакцинации и количество перенёсших COVID-19.

Fig. 1. Dynamics of the main indicators of the COVID-19 epidemic process in Moscow during periods of dominance of the main genetic variants of the pathogen by months.

a — dominant genetic variants of SARS-CoV-2 virus, morbidity and hospitalization; **b** — dynamics of mortality; **c** — dynamics of vaccination and number of people who had undergone COVID-19.

Анализ статистической достоверности различий характеристик эпидемического процесса по выбранным 11 периодам
 Analysis of the statistical significance of differences in the characteristics of the epidemic process for the selected 11 periods

Период Period	Дата начала периода Period start date	Дата окончания периода Period end date	Продолжи- тельность периода, дней Period duration, days	Всего случаев на 100 тыс. населения Total confirmed COVID-19 cases per 100 thousand population	Среднее число случаев в день на 100 тыс. населения (95% ДИ) Mean COVID-19 cases per day per 100,000 population (95% CI)	p (χ^2)	p (критерий Геймса–Хоуэлла) p (Games–Howell test)
Заболееваемость Morbidity							
1	01.03.2020	30.06.2020	120	1771,87	15,96 (13,37–18,55)	Во всех попарных сравнениях $p < 0,05$ In all pairwise comparisons $p < 0,05$	$p_{1-4} = 0,553$; $p_{1-6} = 0,345$; $p_{1-8} = 0,99$; $p_{3-7} = 0,785$; $p_{3-9} = 0,297$; $p_{3-11} = 1,000$; $p_{4-6} = 0,999$; $p_{5-7} = 0,247$; $p_{5-11} = 0,069$; $p_{7-9} = 0,088$; $p_{7-11} = 0,986$; $p_{9-11} = 0,312$. В остальных попарных сравнениях $p < 0,001$ In other pairwise comparisons $p < 0,001$
2	01.07.2020	13.09.2020	75	395,79	5,28 (5,21–5,35)		
3	14.09.2020	02.02.2021	142	5298,96	37,32 (34,76–39,88)		
4	03.02.2021	24.03.2021	50	653,36	13,07 (12,36–13,77)		
5	25.03.2021	18.08.2021	147	4251,58	28,92 (26,39–31,46)		
6	19.08.2021	14.09.2021	27	340,3	12,60 (11,75–13,46)		
7	15.09.2021	22.12.2021	99	3355,99	33,90 (31,11–36,69)		
8	23.12.2021	05.01.2022	14	248,9	17,78 (15,58–19,98)		
9	06.01.2022	23.04.2022	108	5726,54	53,02 (41,00–65,04)		
10	24.04.2022	11.07.2022	79	207,52	2,63 (2,39–2,87)		
11	12.07.2022	13.10.2022	94	3467,54	37,44 (33,09–41,80)		
Смертность Mortality							
1	01.03.2020	30.06.2020	120	30,35	0,27 (0,23–0,31)	$p_{1-4} = 0,700$ $p_{1-6} = 1,000$ $p_{2-11} = 1,000$ $p_{3-5} = 1,000$ $p_{3-7} = 1,000$ $p_{3-8} = 1,000$ $p_{3-9} = 1,000$ $p_{4-6} = 1,000$ $p_{5-7} = 0,193$ $p_{5-8} = 0,747$ $p_{5-9} = 1,000$ $p_{7-8} = 1,000$ $p_{7-9} = 1,000$ $p_{8-9} = 1,000$ В остальных попарных сравнениях $p < 0,001$ In other pairwise comparisons $p < 0,001$	$p_{2-10} = 0,934$; $p_{3-4} = 0,116$; $p_{3-9} = 0,894$; $p_{4-9} = 1,000$; $p_{5-8} = 1,000$; $p_{6-9} = 0,541$. Во всех попарных сравнениях $p < 0,05$ In other pairwise comparisons $p < 0,05$
2	01.07.2020	13.09.2020	75	9,48	0,13 (0,11–0,14)		
3	14.09.2020	02.02.2021	142	68,66	0,48 (0,44–0,50)		
4	03.02.2021	24.03.2021	50	21,74	0,43 (0,42–0,45)		
5	25.03.2021	18.08.2021	147	83,78	0,57 (0,54–0,60)		
6	19.08.2021	14.09.2021	27	10,75	0,40 (0,39–0,41)		
7	15.09.2021	22.12.2021	99	64,08	0,65 (0,62–0,67)		
8	23.12.2021	05.01.2022	14	7,92	0,57 (0,55–0,58)		
9	06.01.2022	23.04.2022	108	48,01	0,44 (0,40–0,49)		
10	24.04.2022	11.07.2022	79	9,16	0,12 (0,11–0,12)		
11	12.07.2022	13.10.2022	94	16,57	0,18 (0,16–0,19)		
Количество госпитализаций Number of hospitalizations							
1	01.03.2020	30.06.2020	120	770,86	6,83 (6,08–7,58)	$p_{1-3} = 1,000$ $p_{2-11} = 0,198$ В остальных попарных сравнениях $p < 0,05$ In other pairwise comparisons $p < 0,05$	$p_{1-4} = 0,957$; $p_{1-8} = 0,481$; $p_{1-9} = 0,104$; $p_{3-5} = 0,611$; $p_{4-8} = 0,369$; $p_{4-9} = 0,193$; $p_{5-7} = 0,491$; $p_{6-9} = 0,610$; $p_{8-9} = 0,768$. В остальных попарных сравнениях $p < 0,01$ In other pairwise comparisons $p < 0,01$
2	01.07.2020	13.09.2020	75	220,19	2,94 (2,83–3,04)		
3	14.09.2020	02.02.2021	142	1306,97	9,98 (9,47–10,48)		
4	03.02.2021	24.03.2021	50	295,19	5,90 (5,71–6,09)		
5	25.03.2021	18.08.2021	147	1363,83	9,28 (8,23–9,73)		
6	19.08.2021	14.09.2021	27	109,33	4,05 (3,85–4,24)		
7	15.09.2021	22.12.2021	99	843,37	8,52 (8,01–9,02)		
8	23.12.2021	05.01.2022	14	77,74	5,55 (5,32–5,79)		
9	06.01.2022	23.04.2022	108	523,15	4,84 (4,10–5,59)		
10	24.04.2022	11.07.2022	79	79,95	1,01 (0,98–1,05)		
11	12.07.2022	13.10.2022	94	200,7	2,18 (2,04–2,32)		

выделять статистически достоверно отличающиеся по набору эпидемиологических характеристик периоды времени, что позволяет использовать их для выявления основных факторов, определявших тенденции основных характеристик эпидемического процесса COVID-19 в 2020–2022 гг.

Период 1 (продолжительность периода составила 120 дней с момента первого подтверждённого случая в начале марта по 30.06.2020). Характеризуется весенним подъёмом заболеваемости, включающим события множественного завоза вируса из-за рубежа в течение марта на территорию Москвы, установлением активной локальной передачи, характеризующейся быстрым подъёмом заболеваемости в апреле и последующим её снижением в результате введения с 29.03.2020 жёстких ограничительных мероприятий («локдаун»). Заболеваемость в данный период составила 1771,87 на 100 тыс. населения (средний уровень — 15,96 на 100 тыс. населения в день). Госпитализация составила 770,86 на 100 тыс. населения (средний уровень 6,83 случая на 100 тыс. населения в день). Смертность в этот период составила 30,35 на 100 тыс. населения (средний уровень — 0,27 случаев на 100 тыс. населения в день). В этот период, вероятно, наблюдался недостаток тест-систем для этиологической диагностики, т.к. почти половина лиц из числа выявленных случаев была госпитализирована. Стоит отметить, что количество проведённых в России тестов по результатам второго полугодия 2020 г. увеличилось в 3,6 раза (19,852 млн тестов в 1-м полугодии против 71,271 млн тестов во 2-м полугодии²). Альтернативным объяснением может быть чрезмерная госпитализация пациентов с COVID-19 в начальный период пандемии в Москве ввиду неопределённости прогноза их состояния и отсутствия сформированной схемы лечения. Госпитальная летальность составила 3,89%, что указывает на то, что среди госпитализируемых наблюдался избыток пациентов с лёгким течением, т.к. в более поздние периоды отмечалась более высокая госпитальная летальность [3].

Период 2 (продолжительность периода составила 75 дней — с 01.07.2020 по 13.09.2020). Характеризуется летней стабилизацией показателей заболеваемости, которая находилась в пределах от 4,25 до 5,58 на 100 тыс. населения в день (средний уровень — 5,28 случая на 100 тыс. населения в день). Стоит отметить, что ограничения типа «локдаун» были сняты 09.06.2020, когда были отменены самоизоляция и пропускной режим. Всего же за данный период было зарегистрировано 395,79 случая COVID-19 на 100 тыс. населения. Было зафиксировано 220,19 случая госпитализации на 100 тыс. населения (средний уровень — 2,94 случая

на 100 тыс. населения в день), смертность в этот период составила 9,48 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 0,13 случая на 100 тыс. населения в день). Летальность в этот период, несмотря на снижение показателей заболеваемости и смертности, была равна 2,4%. Снижение показателей заболеваемости и смертности во втором периоде с высокой вероятностью является результатом действия ограничительных и противоэпидемических мероприятий, введённых в 1-й половине 2020 г., а также может быть дополнительно обусловлена фактором сезонности (смена времени года и переход к летнему периоду), приводящим к снижению эффективности передачи.

Период 3 (продолжительность периода составила 142 дня — с 14.09.2020 по 02.02.2021). Характеризуется осенне-зимним подъёмом заболеваемости. Показатель ежедневной заболеваемости варьировал в пределах от 5,57 до 65,59 на 100 тыс. населения (в среднем — 37,32 случая на 100 тыс. населения в день). Всего за данный период было зарегистрировано 5298,96 случая COVID-19 на 100 тыс. населения. Уровень госпитализации составил 1306,97 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 9,20 случая на 100 тыс. населения в день), смертность в этот период составила 68,66 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 0,48 случая на 100 тыс. населения в день). Рост заболеваемости и смертности в этот период связан со снижением действия ограничительных мероприятий, а также, вероятно, действием сезонного фактора. Ограничительные мероприятия в этот период были не столь жёсткими, как весной 2020 г. Большая часть социальной активности была восстановлена из-за начала работы школ, институтов, выхода на работу людей. В связи с ростом показателей заболеваемости были введены дополнительные ограничительные мероприятия: 1) с 05.10.2020 на удалённую работу были переведены 30% сотрудников организаций; 2) с 09.10.2020 были заблокированы льготные проездные; 3) с 19.10.2020 школьники и студенты были переведены на дистанционный формат обучения. Между тем летальность в этот период составляла уже 1,28%, что указывает на повышение эффективности применяемых протоколов лечения госпитализированных пациентов в Москве.

Период 4 (продолжительность периода составила 50 дней — с 03.02.2021 по 24.03.2021). Характеризуется относительной стабилизацией эпидемического процесса с последующей тенденцией к росту. Заболеваемость в этот период находилась на уровне 13,07 случая на 100 тыс. населения в день. Всего за данный период было зарегистрировано 653,36 случая COVID-19 на 100 тыс. населения. Госпитализация была зарегистрирована на уровне 295,19 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 5,90 случая на 100 тыс. населения в день),

² URL: <https://www.statista.com/statistics/1109794/coronavirus-covid-19-diagnostics-in-russia>

смертность составила 21,74 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 0,43 случая на 100 тыс. населения в день). Этот период выглядит довольно парадоксальным, и его сложно объяснить чем-то, кроме влияния популяционного иммунитета, достигшего к этому времени определённого уровня среди населения города. Частичная отмена ограничительных мероприятий, введённых осенью 2020 г., и наличие факторов сезонности (смена времени года и переход к весеннему периоду) способствуют ухудшению эпидемической обстановки.

Период 5 (продолжительность периода составила 147 дней — с 25.03.2021 по 18.08.2021). Характеризуется весенне-летним подъёмом заболеваемости, вероятнее всего, связанным с появлением варианта Дельта. Период характеризовался более высокими темпами прироста и снижения заболеваемости. Заболеваемость в этот период в Москве находилась на уровне 28,92 случая на 100 тыс. населения в день. Всего за данный период зарегистрировано 4251,58 случаев COVID-19 на 100 тыс. населения. Госпитализация была зарегистрирована на уровне 1363,83 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 9,28 случая на 100 тыс. населения в день), смертность в этот период составила 83,78 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 0,57 случая на 100 тыс. населения в день). Летальность поднялась до 1,97%, что в научной литературе также объясняется свойствами этиологического агента. Причины ухудшения эпидемической ситуации в этот период невозможно выявить с применением только эпидемиологических методов, особенно с учётом периода благополучия в течение периода 4. Необходимо привлечение иммунологических данных по динамике напряжённости популяционного иммунитета, вирусологическим особенностям появившегося генетического варианта Дельта, способных выявить механизмы, по которым стабилизированный процесс на фоне отсутствия жёстких ограничительных мероприятий снова вышел из-под контроля. Следует отметить, что в периоде 5 интенсивность вакцинации населения достигла максимальных значений, а доля вакцинированных составила 20% населения Москвы.

Период 6 (продолжительность периода составила 27 дней — с 19.08.2021 по 14.09.2021) можно охарактеризовать как короткий период сезонного перехода «лето–осень». Отмечены снижение заболеваемости и непродолжительная стабилизация с колебанием заболеваемости в пределах от 8,84 до 17,13 случая на 100 тыс. населения в день (средний уровень — 12,60 случая на 100 тыс. населения в день). Всего за данный период зарегистрировано 340,30 случаев COVID-19 на 100 тыс. населения. Госпитализация была зарегистрирована на уровне 109,33 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 4,05 случая на 100 тыс. населения в день), смертность в этот период составила 10,75 случая на

100 тыс. населения (средний уровень — 0,40 случая на 100 тыс. населения в день). Можно предположить, что, как и в период лета 2020 г., снижение заболеваемости в периоде 6 определяется сезонными факторами и более строгими ограничениями на фоне циркуляции варианта Дельта. Показатель общей летальности за этот период продолжал тенденцию к росту предыдущего и составил 3,17%, а доля госпитализированных среди заболевших достигла 10%.

Период 7 (продолжительность периода составила 99 дней — с 15.09.2021 по 22.12.2021). Характеризуется осенне-зимним подъёмом заболеваемости. Период характеризовался более высокими темпами прироста и снижения заболеваемости. Средний уровень заболеваемости составил 33,90 случая на 100 тыс. населения в день. Всего за данный период было зарегистрировано 3355,99 случаев COVID-19 на 100 тыс. населения. Госпитализация составила 843,37 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 8,52 случая на 100 тыс. населения в день), смертность — 64,08 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 0,65 случая на 100 тыс. населения в день). Вероятно, в этом периоде к факторам, влияющим на развитие эпидемического процесса, добавилось влияние фактора сезонности (смена времени года и переход к осенне-зимнему периоду). Учитывая, что летальность в этот период снижается до 1,9%, можно предположить, что наблюдаемая ситуация отражала повышение степени адаптированности звеньев системы здравоохранения к заболеваемости, вызванной изменённым этиологическим агентом. Существенное снижение заболеваемости в этом периоде можно связать с достижением в популяции значимого уровня популяционного иммунитета, т.к., кроме формирования естественного иммунитета, к окончанию этого периода без малого 40% населения было вакцинировано препаратом «Спутник V». Фактор активной вакцинации в Москве в этот период оказывал обратное действие на проявление эпидемического процесса, обусловленные возбудителем, факторами сезонности. Начиная с 25.10.2021 были введены ограничительные мероприятия, направленные на 1) соблюдение домашнего режима для граждан из группы риска и старше 60 лет; 2) дистанционный режим работы для не менее 30% сотрудников организаций и всех работников старше 60 лет и страдающих хроническими заболеваниями; 3) повышение темпов вакцинации граждан, являющихся сотрудниками сферы услуг.

Период 8 является самым коротким в нашем анализе (продолжительность периода составила 14 дней — с 23.12.2021 по 05.01.2022). Вероятнее всего, этот короткий зимний период снижения заболеваемости объясняется влиянием достигнутого в Москве уровня коллективного иммунитета. Средний уровень заболеваемости составил 17,78 случая

на 100 тыс. населения в день. Всего за данный период было зарегистрировано 248,90 случая COVID-19 на 100 тыс. населения. Госпитализация была зарегистрирована на уровне 77,74 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 5,55 случая на 100 тыс. населения в день), смертность в этот период составила 7,92 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 0,57 случая на 100 тыс. населения в день).

Период 9 (продолжительность периода составила 108 дней — с 06.01.2022 по 23.04.2022). Характеризуется зимне-весенним подъёмом заболеваемости, связанным с появлением варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2. Наблюдался резкий подъём заболеваемости с последующим выраженным снижением. Подъём заболеваемости стал самым интенсивным с начала пандемии. В этот период был зафиксирован максимальный уровень заболеваемости за весь анализируемый период пандемии COVID-19. Всего было зарегистрировано 5726,54 случая COVID-19 на 100 тыс. населения (средней уровень — 53,02 случая на 100 тыс. населения в день). Госпитализация была зарегистрирована на уровне 523,15 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 4,84 случая на 100 тыс. населения в день), смертность в этот период составила 48,01 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 0,44 случая на 100 тыс. населения в день). Как и в случае с периодами 5 и 7, объяснение, почему реализовалось ухудшение эпидемической ситуации в этот период, невозможно получить с применением только эпидемиологических методов анализа. В данной ситуации необходимо привлечение иммунологических данных в части динамики напряжённости коллективного иммунитета, выявления вирусологических особенностей возбудителя. Можно отметить, что непосредственно до периода 9 интенсивность вакцинации населения достигла максимальных значений, что может объяснить снижение летальности до 0,83% на фоне рекордно высокой заболеваемости. Безусловно, это может быть связано и с особенностями этиологического агента, ответ на этот вопрос можно получить в рамках специальных экспериментов, в том числе по исследованию влияния вакцинации на снижение тяжести течения COVID-19.

Период 10 (продолжительность периода составила 79 дней — с 24.04.2022 по 11.07.2022) отмечен весенне-летним снижением заболеваемости, средний уровень которой составил 2,63 случая на 100 тыс. населения в день. Всего за данный период было зарегистрировано 207,52 случая COVID-19 на 100 тыс. населения. Госпитализация была зарегистрирована на уровне 79,95 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 1,01 случая на 100 тыс. населения в день), смертность в этот период составила 9,16 случая на 100 тыс. населения

(средний уровень — 0,12 случая на 100 тыс. населения в день). Период выглядит максимально благополучным, однако в этот период, вероятнее всего, происходит существенный недоучёт количества случаев заболевания, т.к. расчетный уровень летальности достигает 4,56%. Объяснением этого может быть снижение активности этиологической диагностики COVID-19 у населения ввиду уменьшения тяжести течения заболевания COVID-19, вызванного вариантом Омикрон.

Период 11 (продолжительность периода составила 94 дня — с 12.07.2022 по 13.10.2022). Характеризуется летне-осенним подъёмом заболеваемости, связанным с появлением новых генетических линий варианта Омикрон. Наблюдался резкий подъём заболеваемости с последующим интенсивным снижением. Всего за данный период было зарегистрировано 3467,54 случая COVID-19 на 100 тыс. населения (средней уровень — 36,89 случая на 100 тыс. населения в день). Госпитализация была зарегистрирована на уровне 200,70 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 2,14 случая на 100 тыс. населения в день), смертность в этот период составила 16,57 случая на 100 тыс. населения (средний уровень — 0,18 случая на 100 тыс. населения в день). В данном периоде наблюдается рекордно низкая летальность — 0,48%. Вероятнее всего, сумма факторов, таких как изменение свойств этиологического агента, достижение в популяции высокого уровня напряжённости иммунитета и полная готовность госпитального звена системы здравоохранения, позволила достичь такого существенного снижения летальности, фактически приблизившись к показателю летальности от сезонного гриппа.

Анализ половой и возрастной структуры и влияние «локдауна» на первых этапах пандемии COVID-19

В результате анализа отмечены существенные различия в возрастной структуре заболевших COVID-19 в различные периоды пандемии, протекающей на территории города Москвы (**рис. 2**).

В периоды 1 и 2 пандемии COVID-19 заболеваемость распределялась сравнительно равномерно среди всех возрастных групп старше 17 лет и составляла от 10% до почти 40%. В периоды 3 и 4 (осень 2020 г. — весна 2021 г.) описанная ситуация со вкладом в заболеваемость различных возрастных групп в целом сохранялась, но среди пациентов в возрасте 0–17 лет доля заболевших достигла 5%, при этом достоверно уменьшался удельный вес старших возрастных групп (старше 66 лет). Самая высокая доля заболевших в периоде 3 отмечалась в группе 46–65 лет ($p < 0,05$). В последующие периоды наблюдались стабилизация динамики характеристик эпидемического процесса и отсутствие изменений в структуре заболеваемости возрастных

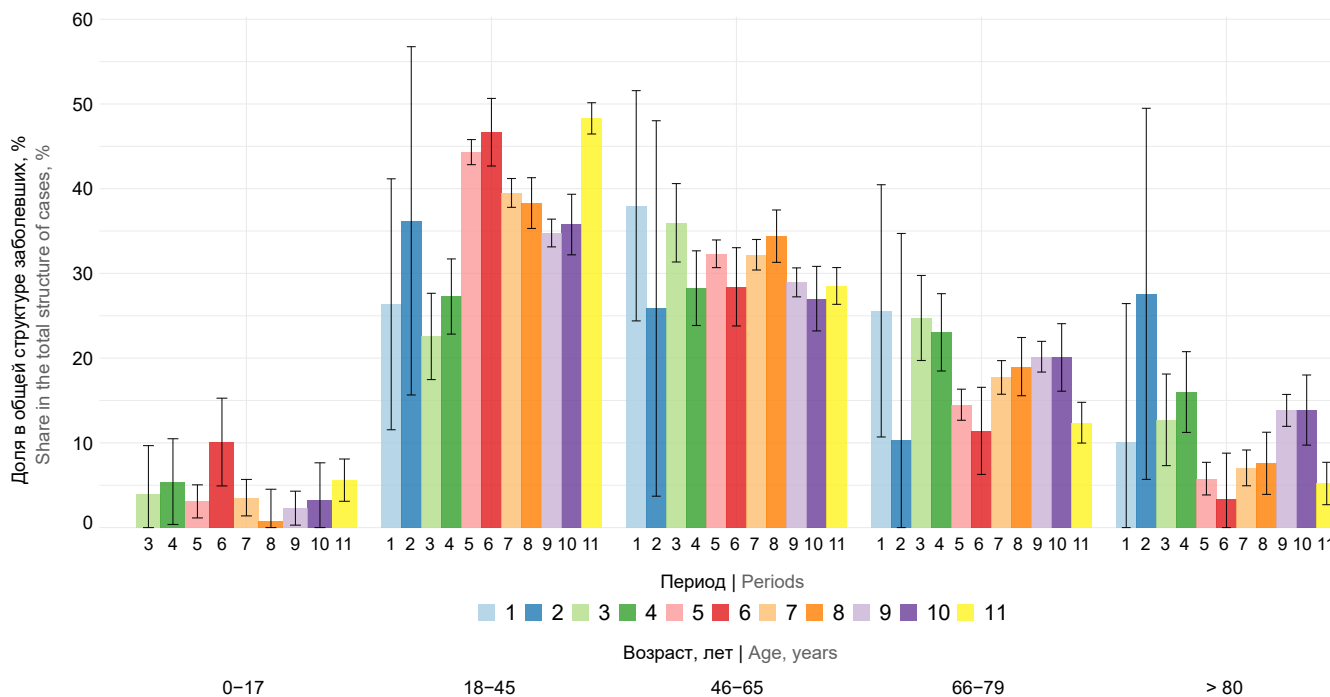


Рис. 2. Возрастная структура пациентов с COVID-19 в Москве с марта 2020 г. по октябрь 2022 г.

Fig. 2. Age structure of patients with COVID-19 in Moscow from March 2020 to October 2022.

групп за исключением периода 11, где, по сравнению с периодами 9 и 10, достоверно увеличился удельный вес групп 18–45, а для групп 66–79 и старше 80 лет он, наоборот, уменьшился. Данное распределение, вероятно, связано с окончательной реализацией высокого контагиозного потенциала варианта Омикрон, в том числе его новых генетических линий, среди лиц активного трудоспособного возраста.

Наблюдения за первыми четырьмя периодами в целом не выявили достоверных изменений во вкладе в заболеваемость различных возрастных групп. Это может являться отражением процесса внедрения действовавших до января 2021 г. ограничительных мероприятий, при которых большое количество лиц трудоспособного возраста и учащихся переводилось на режим удалённой работы/учёбы. В периоды 5 и 6 намечались изменения структуры заболевших со смещением в более молодые возрастные группы. Удельный вес заболевших трудоспособного возраста (18–45 лет) был максимальным. В ходе пандемии медианный возраст заболевших снизился до 44 лет (межквартильный интервал: 31,5–60,9 года). Данное смещение, возможно, связано с ослаблением ограничительных мероприятий, появлением нового варианта SARS-CoV-2 на фоне низкого уровня популяционного иммунитета, недостаточного для сдерживания распространения вируса. В период 11 также отмечается увеличение удельного веса пациентов младше 46 лет. Это, возможно, связано со снижением эффективности про-

граммы вакцинации лиц младше 65 лет, снижением уровня коллективного иммунитета, отсутствием ограничительных мер, что послужило преимущественному включению в эпидемический процесс лиц трудоспособного возраста как более активной части населения.

Среди заболевших пациентов начиная с периода 3 до конца наблюдения преобладали женщины — более 55% ($p < 0,05$; **рис. 3**).

В целом демографические характеристики больных являлись достаточно устойчивыми. Среди заболевших COVID-19 было несколько больше женщин и меньше мужчин, что во многом может быть отражением гендерного состава популяции Москвы с превалированием женщин, особенно в группах риска по возрасту.

Динамика основных показателей эпидемического процесса COVID-19 в Москве в условиях смены доминирующих генетических вариантов возбудителя

Как видно из проведённого анализа, на ряд вопросов не получено ответов. В частности, остаётся не до конца объяснённым циклический характер эпидемического процесса COVID-19 в Москве. Действительно ли смена этиологического агента могла повлиять на наблюдаемые явления и, если это так, то какие именно вирусологические и иммунологические факторы этому способствовали? В случае с проведением программы массовой вакцинопрофилактики не ясно, было ли это действительно факто-

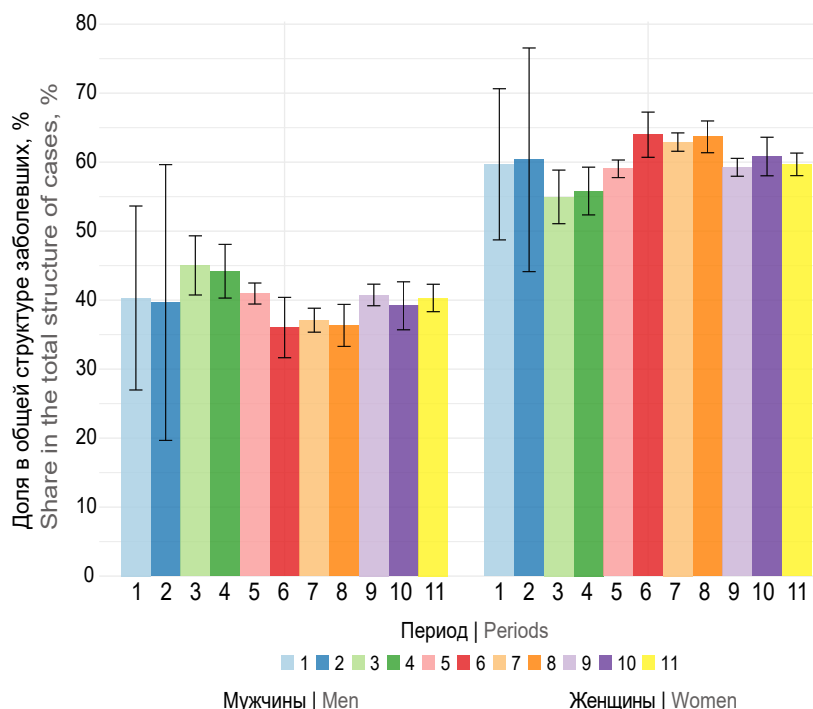


Рис. 3. Половая структура пациентов с COVID-19 в Москве с марта 2020 г. по октябрь 2022 г.
Fig. 3. Sex structure of patients with COVID-19 in Moscow from March 2020 to October 2022.

ром, влияющим на динамику эпидемического процесса, и как менялась эффективность вакцинации в ходе пандемии COVID-19.

В указанный период в Москве доминировали три основных генетических варианта возбудителя COVID-19, включая Ухань, Дельта и Омикрон (рис. 1, а). Согласно полученным результатам, каждый из этих вариантов вызвал по 2 волны заболеваемости, которые были разделены интервалом относительного эпидемического благополучия. Наиболее короткий интервал между пиками заболеваемости был характерен для варианта Дельта, интродукция которого произошла весной 2021 г., тогда как наиболее длительный интервал благополучия был характерен на фоне циркуляции варианта Омикрон, получившего широкое распространение в начале 2022 г. (рис. 4).

За весь изучаемый период заболеваемость COVID-19 характеризовалась достоверной тенденцией к повышению заболеваемости и одновременно к снижению госпитализации и смертности (рис. 4). С учётом циклического характера динамики эпидемического процесса, а также неоднократной смены доминирующего варианта SARS-CoV-2 дополнительно были рассчитаны 3 линии тренда для диапазонов доминирования вариантов Ухань, Дельта и Омикрон. С самого начала пандемии на фоне этиологического агента COVID-19 варианта Ухань (январь 2020 г. — апрель 2021 г.) отмечалась достоверная тенденция к росту всех 3 изучаемых в работе эпидемиологических показателей. В пери-

од доминирования варианта Дельта (май 2021 г. — декабрь 2021 г.) сохранялся достоверный тренд к росту смертности на фоне стабилизации среднего уровня заболеваемости (нет достоверной тенденции к изменению заболеваемости) и достоверной смене направления тенденции случаев госпитализации населения. Во время доминирования варианта Омикрон (январь 2022 г. — ноябрь 2022 г.) динамика всех 3 показателей характеризовалась достоверной тенденцией к снижению.

Исследование динамики интенсивных показателей указывает на то, что наиболее высокой заболеваемость была в период циркуляции варианта Омикрон, которая в пике достигала 5 тыс. на 100 тыс. населения в месяц. В периоды доминирования вариантов Ухань и Дельта динамика госпитализаций в целом соответствовала динамике заболеваемости, хотя с существенно менее выраженными подъёмами и спадами. В период доминирования варианта Омикрон на фоне колоссального роста заболеваемости наблюдалось снижение количества госпитализируемых. Детальный анализ смертности указывает на то, что данный показатель повышался в период распространения варианта Дельта и понижался в период доминирования варианта Омикрон. В период прихода варианта Омикрон количество прошедших вакцинацию и перенесших COVID-19 достигало максимальных значений (рис. 1, в).

Результаты молекулярно-генетического анализа показывают, что в середине интервала доминирования варианта Ухань (сентябрь–октябрь 2020 г.) в

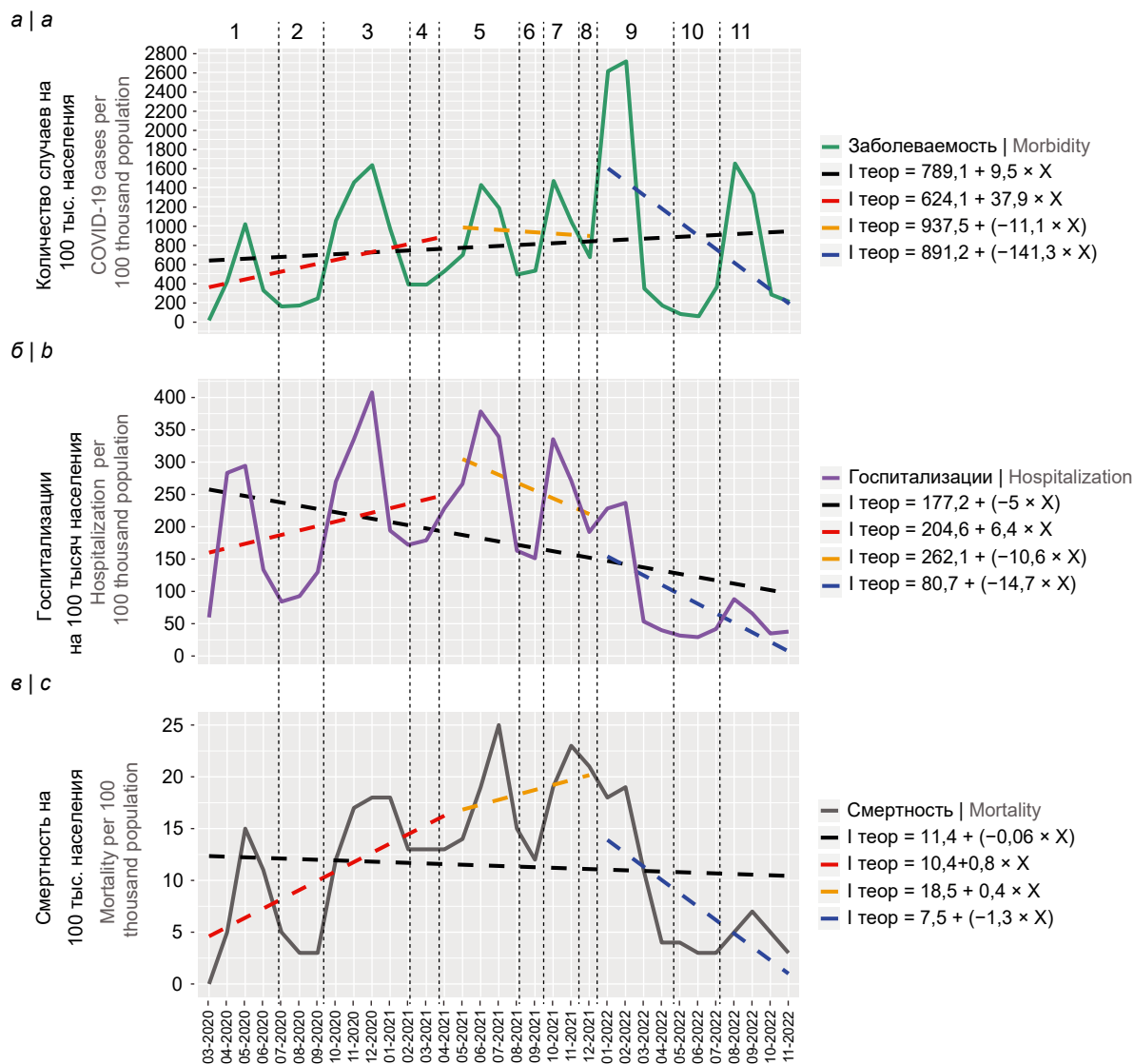


Рис. 4. Интенсивные показатели эпидемического процесса в Москве (на 100 тыс. населения в месяц).

а — динамика показателей заболеваемости; **б** — динамика госпитализации больных; **в** — динамика смертности от COVID-19 за изучаемый период. Черным цветом обозначена общая линия тренда, красным — линия тренда для варианта Ухань, жёлтым — для Дельта, синим — для Омикрон.

Fig. 4. Intensive indicators of the epidemic process in Moscow (per 100 thousand population per month).

а — dynamics of morbidity rates; **б** — dynamics of hospitalization of patients; **с** — dynamics of mortality from COVID-19 during the study period. The general trend line is shown in black, the trend line for the Wuhan variant — in red, for Delta — in yellow, for Omicron — in blue.

Москве начали появляться субварианты, имеющие дополнительные мутации в составе рецептор-связывающего домена (receptor-binding domain, RBD) *A522S*, *N501Y*, *S477N*, *E484K* (рис. 5, а), что может быть одной из причин формирования второго подъёма заболеваемости (рассматриваемый нами период 3). Два цикла подъёма и спада динамики показателей в интервале доминирования варианта Дельта сложно объяснить изменчивостью вируса, т.к. весь этот период наблюдалось почти абсолютное распространение штаммов Дельта с заменами *T478K* и *L452R* (рис. 5, б). В свою очередь чрезвычайная изменчивость RBD варианта Омикрон (рис. 5, в) объясняет столь стремительное распространение

и последовавший второй пик заболеваемости в интервале доминирования Омикрона.

Обсуждение

Выбранные нами для анализа характеристик эпидемического процесса COVID-19 в Москве периоды с марта 2020 г. по октябрь 2022 г. в целом соответствуют данным литературы [1, 3] с тем лишь отличием, что мы выделили все временные отрезки между пиками заболеваемости в самостоятельные периоды, а также включили более поздние события весны–осени 2022 г. В связи с этим наш анализ включает 11 периодов, а не 7 или 5, как у других отечественных авторов. По основным ха-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

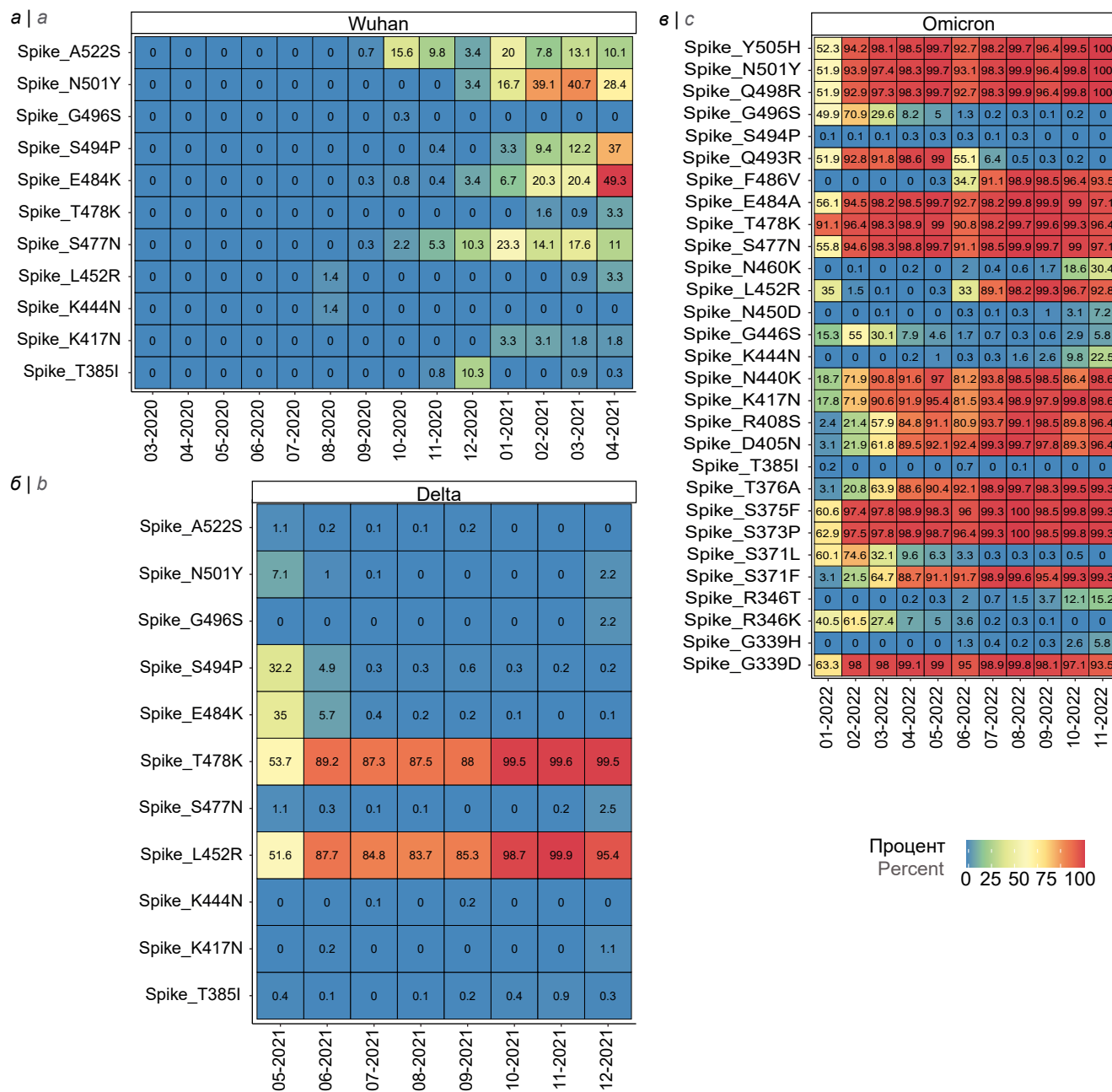


Рис. 5. Помесячная динамика мутаций в рецептор-связывающем домене (RBD) Spike белка уразличных вариантов SARS-CoV-2 Ухань (а), Дельта (б) и Омикрон (в). По оси ординат — основные мутации.

Fig. 5. Monthly dynamics of amino acid changes have been detected in the receptor-binding domain (RBD) spike protein of various SARS-CoV-2 variants Wuhan (a), Delta (b) and Omicron (c). The Y-axis denotes major mutations.

характеристикам эпидемического процесса текущее исследование сходится с результатами исследования Н.И. Брико, проведённом на базе двух медицинских стационаров Москвы. Из 6 подъёмов заболеваемости 3 (включая 1, 5, 9) действительно объясняются распространением новых вариантов возбудителя COVID-19 Ухань, Дельта и Омикрон соответственно, тогда как летнее снижение заболеваемости в периодах 2, 6, 10 сложно объяснить без учёта дополнительных факторов сезонности или динамики напряжённости иммунитета популяции.

К возможному переходу эпидемического процесса к динамике заболеваемости с выраженной сезонностью склоняется ряд отечественных [1] и зарубежных авторов [5]. Вероятно, пока нельзя говорить о строгой сезонности, т.к. ни в одном из изучаемых нами периодов не прекращается циркуляция вируса, однако снижение заболеваемости в весенние, летние или осенние месяцы является достаточно выраженным и, возможно, со временем оно станет ещё более чётким. Так, в периоде 10 наблюдалось самое сильное падение заболеваемости

в летний период. Дальнейший мониторинг позволит оценить истинное влияние сезонных факторов на характеристики эпидемического процесса.

Альтернативным объяснением летней динамики в периодах 2, 6, 10 может быть с самого начала заданная ограничительными мероприятиями и динамикой вакцинальной кампании неоднородность напряжённости иммунитета популяции в целом. Напряжённость иммунитета после вакцинации и ранее перенесённого заболевания изменяется во времени [6]. Оценка влияния напряжённости иммунитета во времени требует наличия качественно собранных и обработанных данных, полученных в рамках как кросс-секционных, так и постоянных мониторинговых исследований с применением банка сывороток [7]. Анализируя циклический характер динамики проявлений эпидемического процесса, нельзя не отметить их парадоксальность в некоторых периодах, выделенных в нашем исследовании. В период 4 наблюдается довольно благоприятная эпидемическая ситуация, несмотря на снятие по всей стране в январе 2021 г. противозидемических и ограничительных мероприятий, основанных на неспецифической профилактике [1, 8]. В этот период росту заболеваемости также должны способствовать сезонные факторы и отсутствие широкого охвата населения прививками. Наиболее вероятным объяснением парадокса в периоде 4 является достижение в популяции уровня иммунитета, способного естественным образом тормозить эпидемический процесс в результате естественного контакта популяции с SARS-CoV-2. К сожалению, существующих в открытом доступе научных данных недостаточно, чтобы с уверенностью говорить о формировании в этот период в Москве коллективного иммунитета такого уровня.

Имеются публикации, оценивающие уровень серопозитивности в отдельных регионах России. Согласно результатам, полученным для Санкт-Петербурга, итогом первой волны COVID-19 было то, что до 30% лиц приобрели иммунитет [9]. Если предположить, что по результатам первой и второй волн заболеваемости (периоды 1 и 3) в Москве иммунитет к SARS-CoV-2 приобрело сравнимое количество людей, то это может означать, что в этот период популяция приблизилась к уровню специфического иммунитета 60%, что в случае возбудителя с базовым репродуктивным числом 2 достаточно для естественного торможения эпидемического процесса вызываемой им инфекции [10]. Последующий рост заболеваемости объясняется необходимостью более высокого уровня популяционного иммунитета по отношению к вариантам Альфа [11] и Дельта [12]. В случае Дельта для достижения коллективного иммунитета с учётом эффективности вакцин требуется охват населения вакцинацией на уровне 90%. Между тем значение этого показателя

на протяжении всего периода нельзя считать достаточным (рис. 4).

Вакцинация препаратом «Спутник V» с доказанной эпидемиологической эффективностью [13] в Москве достигает заметных темпов лишь в период 5, что совпало с появлением и началом циркуляции генетического варианта Дельта в популяции. Второй пик вакцинации и ревакцинации наблюдался осенью 2021 г. и совпал с четвертой волной в период 7, также вызванной продолжением циркуляции варианта Дельта. За 1,5 года вакцинальной кампании было привито чуть более половины взрослого населения Москвы (рис. 4). Это означает, что на протяжении всего изучаемого периода с учётом реального охвата вакцинацией уровень иммунитета, формируемого вакцинацией, не достигал необходимого значения, требуемого для прекращения передачи вируса. Растянutosть во времени вакцинации и контакта популяции с вирусом вызвали новые вопросы, связанные с динамикой формирования напряжённого иммунитета популяции и эффективностью применяемых вакцин в отношении сменяющихся друг друга генетических вариантов возбудителя. Проведённые нами исследования указывают на существенное снижение вируснейтрализующей активности антител в отношении вариантов Дельта [14] и ещё более выраженное — в отношении варианта Омикрон [15]. Ранее нами было продемонстрировано, что успешность распространения варианта Дельта была связана с его способностью накапливаться на слизистых носа и горла, на 2–3 порядка выше такой характеристики для варианта Ухань [16], что повышает эффективность путей передачи и делает заболевших более выраженными источниками инфекции. В случае варианта Омикрон в существенной степени меняются антигенные характеристики возбудителя за счёт интенсивного накопления мутаций в составе RBD, участвующего во взаимодействии с рецептором и являющегося основным сайтом связывания нейтрализующих антител [17]. Это указывает на существование конкретных вирусологически обусловленных механизмов, благодаря которым свойства этиологического агента со временем постоянно повышали требования к значениям уровня специфического иммунитета популяции в отношении как размера иммунной прослойки, так и качества нейтрализующих антител. В промежуточных периодах снижение заболеваемости, вероятно, объясняется временным достижением необходимого уровня напряжённости иммунитета популяции для конкретного этиологического агента, доминировавшего в этот момент.

Динамика госпитализаций во всём изучаемом периоде в целом соответствовала динамике заболеваемости в Москве до периода 9 (до интродукции варианта Омикрон). По нашим оценкам, максимальный уровень числа новых случаев госпитализации

зации в период 1 наблюдался раньше, чем пик заболеваемости, что совпадает с результатами других отечественных авторов [3]. Во время периодов 2 и 4, характеризующихся стабилизацией показателя заболеваемости, отмечается увеличение количества госпитализаций. Это может указывать на асинхронность динамики госпитализации и динамики заболеваемости, что может отражать особенности работы госпитального звена здравоохранения в Москве, включающие изменение размера коечного фонда стационаров и требований к госпитализации [3]. Периоды 9 и 11, сопровождавшиеся циркуляцией варианта Омикрон, в отличие от других периодов, характеризовались более выраженными подъёмами заболеваемости. Уровни заболеваемости были в несколько раз выше, чем ранее, однако число госпитализированных пациентов в периоды 9 и 11 существенно снизилось по сравнению с другими периодами. На снижение показателя госпитализации могло повлиять несколько факторов, в том числе свойства этиологического агента, а также достигнутый уровень иммунитета популяции. Согласно теории саморегуляции паразитарных систем В.Д. Белякова, появляющиеся новые варианты вируса SARS-CoV-2 становятся менее патогенными для человека, но более контагиозными. Именно к такому объяснению пришли В.Г. Акимкин и соавт. [1].

Стоит отметить, что к периоду распространения варианта Омикрон в мире не осталось популяций, иммунологически наивных в отношении антигенов SARS-CoV-2, в связи с чем исследование тяжести течения COVID-19, вызванного вариантом Омикрон, не представляется возможным. Некоторое усиление тяжести инфекционного процесса, вызванного отдельными сублиниями варианта Омикрон, недавно было показано сотрудниками НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи в исследовании с использованием животной модели [19]. Однако в рамках этой модели выявлено, что вирулентные свойства вируса все же сохраняются. В этой связи невозможно достоверно утверждать, что снижение тяжести течения в период доминирования Омикрон действительно связано только с вирусологическими особенностями данного варианта. Не следует игнорировать формирование напряжённого уровня иммунитета как фактора снижения тяжести течения болезни. Влияние вакцинации на снижение тяжести течения для различных групп населения Москвы неоднократно подтверждено результатами исследований в периоды циркуляции вариантов Ухань, Дельта и Омикрон [19–21].

Представленные в настоящем исследовании результаты указывают на высокую ценность комплексного анализа проявлений эпидемического процесса COVID-19 (заболеваемости, госпитализации, смертности) и молекулярно-генетических данных об изменчивости возбудителя, позволяющего своевременно оценивать вероятные риски ухудшения

эпидемиологической ситуации. Полученные данные прямо указывают на то, что варианты вируса в существенной степени меняют характер эпидемического процесса. В период циркуляции исходного варианта Ухань (периоды 1–3) в отсутствие средств специфической вакцинопрофилактики снижение заболеваемости достигалось жёсткими немедикаментозными мерами, включая запрет на въезд в Россию иностранных граждан из наиболее поражённых инфекцией стран до полного закрытия государственных границ и прекращения международного авиасообщения [1, 22, 23]. Вводились существенные ограничения для снижения социальных контактов внутри страны, включавшие изоляцию заболевших COVID-19 и контактировавших с ними людей, введение пропускного режима, перевод на удалённую работу и учёбу и т.д. В период распространения варианта Дельта (периоды 5–8) стали доступны и применялись высокоэффективные вакцины «Спутник V» и «Спутник Лайт». К сожалению, к моменту интродукции варианта Дельта охват вакцинацией и иммунитет, сформированный в результате перенесённого COVID-19, не позволили достичь необходимого уровня иммунитета популяции. Между тем заболеваемость в период доминирования варианта Дельта уже не достигала уровней заболеваемости второго пика, вызванного вариантом Ухань, что указывает на действенность, хотя бы частично, иммунной прослойки, достигнутой в предыдущих периодах, в том числе с применением вакцинации. Это, вероятно, уберегло от летального исхода существенное количество людей, в том числе активно вакцинировавшихся летом 2021 г. Количество госпитализаций в период доминирования варианта Дельта не увеличилось, однако даже при сниженной заболеваемости в этот период смертность в оба пика была выше по сравнению с предыдущими этапами пандемии (рис. 4), что указывает на высокую вирулентность варианта Дельта по отношению к ранее циркулировавшему варианту вируса SARS-CoV-2. Активная политика Департамента здравоохранения Москвы в отношении вакцинации в период доминирования варианта Дельта также способствовала тому, что к приходу варианта Омикрон совокупная доля лиц, имеющих антитела, приблизилась к 100%. На это указывают результаты скрининговых исследований участников клинических испытаний, проводимых в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Заключение

Проведённый анализ указывает на то, что существенная часть динамики характеристик эпидемического процесса в Москве может объясняться свойствами возбудителя, сезонностью и динамикой напряжённости иммунитета. Проведённый молекулярно-эпидемиологический мониторинг COVID-19 позволил выявить меняющиеся свойства

этиологического агента SARS-CoV-2 и их влияние на эпидемиологическое благополучие. Изменчивость вируса SARS-CoV-2, в том числе в RBD, оказывает влияние на эффективность существующих схем профилактики и терапии, поэтому имеется необходимость постоянной корректировки стратегии контроля за продолжающейся пандемией, в том числе для пересмотра применяющихся средств диагностики, вакцинопрофилактики и лечения [24].

В случае варианта Дельта произошло повышение роли заболевших как источника инфекции за счёт увеличения вирусной нагрузки на слизистых, более активного выделения вируса в окружающую среду и, как следствие, повышения активности путей передачи инфекции. В случае прихода варианта Омикрон наблюдается изменение антигенной специфичности RBD, что способствует уходу вируса от нейтрализующих антител, и, в итоге, снижение уровня защищённости. Влияние динамики показателей напряжённости коллективного иммунитета на ход эпидемического процесса предстоит изучить дополнительно. Выявление маркеров протективности существенно упростит данную задачу.

Между тем очевидно, что молекулярно-генетический мониторинг SARS-CoV-2 является важнейшим компонентом эпидемиологического надзора, способствующим более рациональному принятию управленческих решений по предотвращению дальнейшего распространения новой коронавирусной инфекции и снижению экономико-социальных последствий пандемии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Акимкин В.Г., Попова А.Ю., Плоскирева А.А. и др. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение I: проявления эпидемического процесса COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022;99(3):269–86. Akimkin V.G., Popova A.Yu., Ploskireva A.A., et al. COVID-19: the evolution of the pandemic in Russia. Report I: manifestations of the COVID-19 epidemic process. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(3):269–86. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-276> EDN: <https://elibrary.ru/zxgftfd>
- Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А. и др. Гендерно-возрастная характеристика пациентов с COVID-19 на разных этапах эпидемии в Москве. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(3):27–35. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenenko T.A., et al. Gender-age distribution of patients with COVID-19 at different stages of epidemic in Moscow. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(3):27–35. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-27-35> EDN: <https://elibrary.ru/idsdet>
- Брико Н.И., Коршунов В.А., Краснова С.В. и др. Клинико-эпидемиологические особенности пациентов, госпитализированных с COVID-19 в различные периоды пандемии в Москве. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022;99(3):287–99. Briko N.I., Korshunov V.A., Krasnova S.V., et al. Clinical and epidemiological characteristics of hospitalized patients with COVID-19 during different pandemic periods in Moscow. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(3):287–99. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-272> EDN: <https://elibrary.ru/iwbqvxv>
- Акимкин В.Г., Попова А.Ю., Хафизов К.Ф. и др. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение II: динамика циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022;99(4):381–96. Akimkin V.G., Popova A.Yu., Khafizov K.F., et al. COVID-19: evolution of the pandemic in Russia. Report II: dynamics of the circulation of SARS-CoV-2 genetic variants. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(4):381–96. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-295> EDN: <https://elibrary.ru/kvulas>
- Fontal A., Bouma M.J., San-José A., et al. Climatic signatures in the different COVID-19 pandemic waves across both hemispheres. *Nat. Comput. Sci*. 2021;1:655–65. DOI: <https://doi.org/10.1038/s43588-021-00136-6>
- Комбаров С.Ю., Алешкин А.В., Новикова Л.И. и др. Особенности гуморального ответа на инфекцию, вакцинацию и ревакцинацию при COVID-19. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022;173(6):719–725. Kombarova S.Yu., Aleshkin A.V., Novikova L.I., et al. Features of the humoral response to infection, vaccination, and revaccination during COVID-19. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2022;173(6):734–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05620-1> EDN: <https://elibrary.ru/lickdm>
- Гушин В.А., Мануйлов В.А., Мазунина Е.П. и др. Иммунологическая память как основа рациональной вакцинопрофилактики населения. Обоснование создания системы сероэпидемиологического мониторинга в России. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2017;(5):5–28. Gushchin V.A., Manuilov V.A., Mazunina E.P., et al. Immunological memory as a basis for a wise vaccination strategy. a rationale for introducing a comprehensive seroepidemiological surveillance system in Russia. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2017;(5):5–25. DOI: <https://doi.org/10.24075/brsmu.2017-05-01> EDN: <https://elibrary.ru/zwrtdtx>
- Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Колосовская Е.Н. и др. Характеристика эпидемиологической ситуации по COVID-19 в Санкт-Петербурге. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021;98(5):497–511. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Kolosovskaya E.N., et al. Assessment of the COVID-19 epidemiological situation in St. Petersburg. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5):497–511. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-154> EDN: <https://elibrary.ru/dtmnhz>
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А. и др. Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период эпидемии COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(3):124–30. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., et al. Herd immunity to SARS-CoV-2 among the population in Saint-Petersburg during the COVID-19 epidemic. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(3):124–30. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-124-130> EDN: <https://elibrary.ru/oxhool>
- Liu Y., Gayle A.A., Wilder-Smith A., Rocklöv J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *J. Travel Med*. 2020;27(2):taaa021. DOI: <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa021>
- Davies N.G., Abbott S., Barnard R.C., et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*. 2021;372(6538):eabg3055. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abg3055>

12. Liu Y., Rocklöv J. The reproductive number of the Delta variant of SARS-CoV-2 is far higher compared to the ancestral SARS-CoV-2 virus. *J. Travel Med.* 2021;28(7):taab124. DOI: <https://doi.org/10.1093/jtm/taab124>
13. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet.* 2021;397(10275):671–81. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00234-8)
14. Gushchin V.A., Dolzhikova I.V., Shchetinin A.M., et al. Neutralizing activity of sera from Sputnik V-vaccinated people against variants of concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow endemic SARS-CoV-2 variants. *Vaccines (Basel).* 2021;9(7):779. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines9070779>
15. Lapa D., Grousova D.M., Matusali G., et al. Retention of neutralizing response against SARS-CoV-2 Omicron variant in Sputnik V-vaccinated individuals. *Vaccines (Basel).* 2022;10(5):817. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines10050817>
16. Gushchin V.A., Pochtovyi A.A., Kustova D.D., et al. Dynamics of SARS-CoV-2 major genetic lineages in Moscow in the context of vaccine prophylaxis. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(23):14670. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232314670>
17. Jung C., Kmiec D., Koepke L., et al. Omicron: What makes the latest SARS-CoV2 variant of concern so concerning? *J. Virol.* 2022;96(6):e0207721. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.02077-21>
18. Dolzhikova I., Grousova D., Zorkov I., et al. Pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron BA.5 and BE.1 variants in Syrian hamsters and ACE2-transgenic mice. *Preprints.* 2022;2022120202. DOI: <https://doi.org/10.20944/preprints202212.0202.v1>
19. Gushchin V.A., Tsyganova E.V., Ogarkova D.A., et al. Sputnik V protection from COVID-19 in people living with HIV under antiretroviral therapy. *EClinicalMedicine.* 2022;46:101360. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101360>
20. Sukhikh G.T., Pripitnevich T.V., Ogarkova D.A., et al. Sputnik Light and Sputnik V vaccination is effective at protecting medical personnel from COVID-19 during the period of Delta variant dominance. *Vaccines (Basel).* 2022;10(11):1804. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines10111804>
21. Shkoda A.S., Gushchin V.A., Ogarkova D.A., et al. Sputnik V effectiveness against hospitalization with COVID-19 during Omicron dominance. *Vaccines (Basel).* 2022;10(6):938. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines10060938>
22. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Смоленский В.Ю. и др. Эпидемиологические особенности новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Сообщение 1: Модели реализации профилактических и противоэпидемических мероприятий. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020;(1):6–13. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Smolenskii V.Yu., et al. Epidemiological features of new coronavirus infection (COVID-19). Communication 1: modes of implementation of preventive and anti-epidemic measures. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2020;(1):6–13. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-6-13> EDN: <https://elibrary.ru/xgryta>
23. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Смоленский В.Ю. и др. Эпидемиологические особенности новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Сообщение 2: особенности течения эпидемического процесса COVID-19 во взаимосвязи с проводимыми противоэпидемическими мероприятиями в мире и Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020;(2):6–12. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Smolenskii V.Yu., et al. Epidemiological peculiarities of new coronavirus infection (COVID-2019). Communication 2: peculiarities of epidemic process development in conjunction with performed anti-epidemic measures around the world and in the Russian Federation. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2020;(2):6–12. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-6-12> EDN: <https://elibrary.ru/yjypln>
24. Гушин В.А. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг и оценка эффективности средств специфической диагностики и вакцинопрофилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19): Дисс. ... д-ра биол. наук. М.;2023. Gushchin V.A. *Molecular epidemiological monitoring and evaluation of the effectiveness of specific diagnostics and vaccination of new coronavirus infection (COVID-19):* Diss. Moscow;2023.

Информация об авторах

Гушин Владимир Алексеевич — к.б.н., зав. лаб. механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов и референс-центра по коронавирусной инфекции НИЦЭИМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия; с.н.с. каф. вирусологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9397-3762>

Почтовый Андрей Андреевич[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов НИЦЭИМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, a.pochtovyy@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0003-1107-9351>

Кустова Дарья Дмитриевна — лаборант-исследователь лаб. механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов НИЦЭИМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия; магистрант каф. вирусологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8382-275X>

Огаркова Дарья Алексеевна — м.н.с. лаб. механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов НИЦЭИМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1152-4120>

Клейменов Денис Александрович — к.м.н., зав. лаб. трансляционной биомедицины НИЦЭИМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9422-7238>

Information about the authors

Vladimir A. Gushchin — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of mechanisms of population variability of pathogenic microorganisms, Reference center for coronavirus infection, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia; senior researcher, Department of virology, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9397-3762>

Andrei A. Pochtovyy[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of mechanisms of population variability of pathogenic microorganisms, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, a.pochtovyy@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0003-1107-9351>

Daria D. Kustova — laboratory assistant-researcher, Laboratory of mechanisms of population variability of pathogenic microorganisms, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia; postgraduate student, Department of virology, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8382-275X>

Darya A. Ogarkova — junior researcher, Laboratory of mechanisms of population variability of pathogenic microorganisms, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1152-4120>

Denis A. Kleymenov — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of translational biomedicine, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9422-7238>

Семеновна Татьяна Анатольевна — д.м.н., профессор, рук. отдела эпидемиологии НИЦЭИМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Логунов Денис Юрьевич — д.б.н., академик РАН, зав. лаб. клеточной микробиологии НИЦЭИМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Злобин Владимир Игоревич — д.м.н., профессор, академик РАН, г.н.с. лаб. механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов НИЦЭИМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1862-0609>

Гинцбург Александр Леонидович — д.б.н., профессор, академик РАН, директор НИЦЭИМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия; зав. каф. инфектологии и вирусологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Участие авторов. *Гущин В.А., Почтовый А.А.* — концепция и дизайн исследования, написание; *Кустова Д.Д., Огаркова Д.А.* — сбор и обработка материала, статистическая обработка; *Клейменов Д.А., Семеновна Т.А., Логунов Д.Ю., Злобин В.И.* — написание и редактирование; *Гинцбург А.Л.* — концепция и дизайн исследования. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 13.06.2023;
принята к публикации 08.08.2023;
опубликована 28.08.2023

Tatiana A. Semenenko — Doct. Sci. (Med.), Prof., Head, Department of epidemiology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Denis Y. Logunov — Doct. Sci. (Biol.), Full Member of RAS, Head, Laboratory of cell microbiology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Vladimir I. Zlobin — Doct. Sci. (Med.), Full Member of RAS, main researcher, Laboratory of mechanisms of population variability of pathogenic microorganisms, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1862-0609>

Alexander L. Gintsburg — Doct. Sci. (Biol.), Full Member of RAS, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia; Head, Department of infectiology and virology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Author contribution. *Gushchin V.A., Pochtovyi A.A.* — research concept and design, editing; *Kustova D.D., Ogarkova D.A.* — collection and processing of material, statistical processing; *Kleymentov D.A., Semenenko T.A., Logunov D.Y., Zlobin V.I.* — writing and editing; *Gintsburg A.L.* — research concept and design. 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 13.06.2023;
accepted for publication 08.08.2023;
published 28.08.2023



Spectrum and functional properties of *ERG11* gene mutations in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains isolated from HIV-infected patients

Yuri V. Nesvizhsky^{1,2✉}, Stanislav S. Afanasiev², Alexander D. Voropaev¹, Yulia N. Urban², Mariam E. Suleymanova³, Maxim S. Afanasiev¹, Elena V. Budanova¹, Elena A. Voropaeva²

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

²G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

³Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia

Abstract

Rationale. The low efficacy of azole antimycotics in treatment of *Candida* infections, especially in HIV-infected patients, is often associated with overexpression of the *ERG11* gene in *Candida* spp., which results in increased production of ergosterol – the target of the above antimycotic drugs. Researchers have found *ERG11* gene mutations that can modify its overexpression effects by increasing or decreasing it. However, the findings reported by different laboratories and countries are highly contradictory.

The **purpose** of the study is to explore the spectrum and functional properties of *ERG11* gene mutations in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains isolated from HIV-infected patients.

Materials and methods. The study was performed using 10 *C. albicans* strains inherently resistant to fluconazole and voriconazole and isolated from the oropharynx of HIV-infected patients; the strains were provided from the collection of the Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology. The strains were assessed by their sensitivity to antimycotic agents: anidulafungin, micafungin, caspofungin, posaconazole, voriconazole, itraconazole, fluconazole, amphotericin B, 5-flucytosine. Expression levels of the *ERG11* gene were measured by quantitative PCR. *ERG11* gene mutations were identified by Sanger sequencing.

Results. Five mutations (*E266D*, *G464S*, *I471L*, *D116E*, and *V488I*) were detected in the *ERG11* gene in seven *C. albicans* strains; six strains carried non-associated co-occurring mutations. Increased expression of the *ERG11* gene was found in six *C. albicans* strains. The *V488I* mutation demonstrated a strong negative association with the increased expression of the *ERG11* gene ($r = -0.845$; $p < 0.05$). The minimum inhibitory concentration (MIC) in strains carrying mutations was a hundred times as low ($p < 0.05$) as MIC in strains without mutations. In mutation carriers, posaconazole and itraconazole MICs were on average 16.5 times as low as MICs of voriconazole and fluconazole ($p < 0.001$). The presence of mutations in the *ERG11* gene had almost no effect on MICs of the tested antimycotics of the echinocandin, polyene, and pyrimidine groups.

Conclusion. Multiple mutations were detected in the *ERG11* gene in most of the *C. albicans* strains isolated from HIV-infected patients and resistant to fluconazole and voriconazole. Except for the *V488I* mutation, the detected mutations were not associated with the overexpression of the *ERG11* gene and decreased the effects of overexpression of the *ERG11* gene by up to 100 times, though they did not eliminate the inherent resistance to triazole antimycotics.

Keywords: *Candida*, *ERG11* gene, mutations, resistance to antimycotic agents, HIV infection

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the South Ural State Medical University (protocol No. 4, April 25, 2014).

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: Nesvizhsky Yu.V., Afanasiev S.S., Voropaev A.D., Urban Yu.N., Suleymanova M.E., Afanasiev M.S., Budanova E.V., Voropaeva E.A. Spectrum and functional properties of *ERG11* gene mutations in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains isolated from HIV-infected patients. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(4):285–292. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-407>. EDN: <https://www.elibrary.ru/pxrovi>

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-407>

Спектр и функциональные свойства мутаций гена *ERG11* флуконазол-резистентных грибов *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов

Несвижский Ю.В.^{1,2✉}, Афанасьев С.С.², Воропаев А.Д.¹, Урбан Ю.Н.², Сулейманова М.Э.³, Афанасьев М.С.¹, Буданова Е.В.¹, Воропаева Е.А.²

¹Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

²Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия;

³Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. Низкая эффективность терапии кандидозной инфекции азоловыми препаратами, особенно у ВИЧ-инфицированных пациентов, зачастую связана с гиперэкспрессией в грибах *Candida* spp. гена *ERG11*, которая обуславливает повышение объёма синтеза эргостерола — мишени данных препаратов. Обнаружены мутации гена *ERG11*, способные модифицировать эффекты его гиперэкспрессии путём как усиления, так и снижения. Однако сведения, полученные в различных лабораториях и странах, весьма противоречивы.

Цель работы — исследовать спектр и функциональные свойства мутаций гена *ERG11* в устойчивых к флуконазолу штаммах *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 10 штаммах грибов *C. albicans*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов и изначально устойчивых к действию флуконазола и вориконазола, из коллекции Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского. Штаммы были охарактеризованы по чувствительности к антимикотическим препаратам: анидулафунгину, микафунгину, каспофунгину, позаконазолу, вориконазолу, итраконазолу, флуконазолу, амфотерицину В, 5-флуцитозину. Уровень экспрессии гена *ERG11* измеряли с помощью количественной ПЦР. Мутации гена *ERG11* выявляли путём его секвенирования по Сэнгеру.

Результаты. В 7 штаммах *C. albicans* в структуре гена *ERG11* были обнаружены 5 вариантов мутаций (*E266D*, *G464S*, *I471L*, *D116E* и *V488I*), 6 штаммов оказались носителями сочетанных мутаций, которые не имели сопряжения. В 6 исследованных штаммах *C. albicans* была установлена повышенная экспрессия гена *ERG11*. Для мутации *V488I* была характерна сильная отрицательная связь с повышенной экспрессией гена *ERG11* ($r = -0,845$; $p < 0,05$). Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) штаммов — носителей мутации была на 2 порядка ниже ($p < 0,05$), чем штаммов без мутаций. У носителей мутаций МИК позаконазола и итраконазола были в среднем в 16,5 раза ниже, чем МИК вориконазола и флуконазола ($p < 0,001$). Наличие мутаций в гене *ERG11* практически не отражалось на уровне МИК тестированных антимикотиков группы эхинокандинов, полиенов и пиримидина.

Заключение. В большинстве штаммов *C. albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов и устойчивых к флуконазолу и вориконазолу, выявлен ряд мутаций в гене *ERG11*. За исключением *V488I* обнаруженные мутации не имели сопряжения с повышенной экспрессией гена *ERG11* и снижали эффекты гиперэкспрессии гена *ERG11* до 100 раз, хотя полностью не отменяли исходной резистентности к триазоловым препаратам.

Ключевые слова: *Candida*, ген *ERG11*, мутации, резистентность к антимикотическим препаратам, ВИЧ-инфекция

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Комитетом по этике Южноуральского государственного медицинского университета (протокол № 4 от 25.04.2014).

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: Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Воропаев А.Д., Урбан Ю.Н., Сулейманова М.Э., Афанасьев М.С., Буданова Е.В., Воропаева Е.А. Спектр и функциональные свойства мутаций гена *ERG11* флуконазол-резистентных грибов *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):285–292. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-407> EDN: <https://www.elibrary.ru/pxrovi>

Introduction

The widespread use of fluconazole in the prevention and treatment of *Candida* infection, especially among immunocompromised individuals, promoted the resistance to azole antimycotics among fungi of the genus *Candida* [1, 2]. *Candida* spp. frequently display overexpression of genes encoding the synthesis of the antimycotic drug target. An important role belongs to the *ERG11* gene encoding lanosterol 14- α -demethylase. This enzyme participates in the final step of the synthesis of ergosterol – an integral part of the fungal cell membrane and the target of azole antimycotics. Overexpression of the *ERG11* gene results in elevated ergosterol synthesis, thus decreasing the *Candida* species sensitivity to therapeutic dosages of antimycotics [3]. At the same time, fluconazole can promote the development of the mechanism of microbial drug resistance [4], which, in its turn, is especially high against short-chain azoles like fluconazole [5].

A number of mutations detected in the *ERG11* gene can modify the effects of its overexpression to a certain extent. They were associated both with an increase and with a decrease in resistance to azoles [6–10]. However, the findings reported by different laboratories and countries are highly contradictory.

The **purpose** of the study is to explore the spectrum and functional properties of *ERG11* gene mutations in fluconazole-resistant *C. albicans* strains isolated from HIV-infected patients.

Materials and methods

The study was performed using 10 *C. albicans* strains inherently resistant to fluconazole and voriconazole from the collection of the Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor.

C. albicans strains were assessed by:

- the level of expression and the presence of mutations in the *ERG11* gene encoding lanosterol 14- α -demethylase;
- sensitivity to a number of antimycotic drugs belonging to triazole, echinocandin, polyene, and pyrimidine groups.

The *C. albicans* strains were isolated from the oropharynx of HIV-infected patients aged 20–69 years, having clinical manifestations of oropharyngeal candidiasis and undergoing treatment in Infectious Disease Clinical Hospital No. 2 in Moscow. HIV infection in all the patients was diagnosed using clinical and epidemiological data and confirmed by the detection of specific antibodies/antigens using enzyme immunoassay and lysate-based immunoblot assay for antibodies against human immunodeficiency virus proteins (Profiblot 48 TECAN, AutoBlot 3000) in accordance with the clinical classification of HIV infection¹. All the participating

patients signed their informed consent allowing the use of the laboratory test data for scientific purposes. All studies were carried out with the approval of the Ethics Committee of the South Ural State Medical University (minutes No. 4, 25/4/2014) in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki adopted by the World Medical Association in 1964 and outlining the ethical principles for medical research involving human subjects.

Identification of *C. albicans* species was performed using different methods:

1. Approximate differentiation of fungi by colony color after incubation on specific chromogenic media (Oxoid, HiMedia) at 37°C for 24–48 hours in accordance with the manufacturer's instruction;

2. Assessment of biochemical activity following the incubation of standardized cell suspensions in the wells of plates of the Remel RapID YEAST PLUS and ErbaLachema commercial biochemical test systems at 37°C in accordance with the manufacturer's instruction. The results were measured visually or semi-automatically in each well and interpreted in accordance with the manufacturer's instruction or using the respective software.

3. Real-time multiplex polymerase chain reaction (real-time PCR) using the AmpliSens *C.albicans/C. glabrata/C. krusei* — MULTIPRIME-FL reagent kit for simultaneous hybridization-fluorescence detection of *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. krusei* DNA. DNA was extracted from *Candida* spp. pure cultures using DNA-sorb-AM reagent kits (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor) in accordance with the manufacturer's instruction. The Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System was used for amplification.

The sensitivity to echinocandins (anidulafungin, micafungin, caspofungin), azoles (posaconazole, voriconazole, itraconazole, fluconazole), amphotericin B, and 5-flucytosine was evaluated. The analysis was performed in accordance with the recommendations issued by the Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy for testing sensitivity of microorganisms to antimicrobial agents with reference to CLSI M44 and M60 standards for *Candida* spp. as well as standards and criteria of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing for the microdilution method and bacterial cultures².

The minimum inhibitory concentration of the agent (MIC; mg/ml) was measured by serial microdilutions using Sensititre YeastOne10 plates (Trek Diagnostic System) in accordance with the manufacturer's instruction. The inoculum was prepared in the similar way as for the

¹ Russian clinical classification of HIV infection. URL: <https://base.garant.ru/12145892> (In Russ.)

² Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs: Recommendations. 2021. URL: <https://www.antibiotic.ru/minzdrav/category/clinical-recommendations/>

disk diffusion method, then it was placed into the modified RPMI-1640 medium and distributed into 96-well plates containing serial microdilutions of antimycotic substances [11]. The results were measured visually by comparing with the growth in the positive control well in accordance with the criteria of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [12].

Levels of *ERG11* gene expression were measured by quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [13]. RNA was extracted from a pure daily culture of the studied strain using the ExtractRNA reagent (Evrogen) in accordance with the manufacturer's instruction. The reverse transcription was carried out using the Reverta-L kit (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor) in accordance with the manufacturer's instruction: 30 min at 37°C. The following primers were used for PCR:

ERG11:

- F — aactacttttgtttataatttaagatggactattga;
- R — aatgatttctgctggttcagtaggt;

PMA1:

- F — ttgaagatgaccaccaatcc;
- R — gaaacctctggaagcaaatgg;

ACT1:

- F — ttggtgatgaagcccaatcc;
- R — catatcgtcccagttggaaca.

The amplification was performed using the reagent kit for real-time PCR in the presence of Sybr-Green I intercalating dyes (Syntol) and the Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System in accordance with the following parameters: 95°C, 3 min; 40 cycles at 95°C, 10 sec, 55°C, 20 sec.

The *ACT* and *PMA* housekeeping genes were used as control genes. The reference $2^{-\Delta\Delta CT}$ values for the *ERG11* gene were obtained by analyzing sensitive isolates ($n = 7$). The expression level of the studied strain was considered significantly increased, if it was higher than the reference mean values for sensitive isolates (m) by more than 3 standard deviations (3σ).

For Sanger sequencing of the *ERG11* gene [14], the following primers were used:

ERG11-1:

- F — atggctattgttgaactgtcatt;
- R — ggatcaatcaccacgttctc;

ERG11-2:

- F — attggagacgtgatgctgctcaa;
- R — ccaaatgatttctgctggttcagt.

The *ERG11* gene was amplified for sequencing using the Qiagen PCR Master Mix, 2x reagent kit and the Applied Biosystems Veriti thermal cycler in accordance with the protocol: 95°C for 15 min; 35 cycles at 95°C for 40 sec, 60°C for 40 sec, 72°C for 1.5 min; then at 72°C for 10 min. The PCR products were purified using the ExoSAP-IT kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) in accordance with the manufacturer's instruction. The sequencing reaction was performed with the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

Table 1. Mutations identified in the *ERG11* gene

Mutation	Abs.	%
<i>E266D</i>	4	40
<i>G464S</i>	2	20
<i>I471L</i>	1	10
<i>D116E</i>	3	30
<i>V488I</i>	3	30

Table 2. Associations of mutations identified in the *ERG11* gene

Mutation	Abs.	%	Association coefficient
<i>E266D + G464S</i>	1	10	0,100
<i>E266D + D116E</i>	2	20	0,356
<i>E266D + V488I</i>	1	10	0,089
<i>V488I + I471L</i>	1	10	0,409
<i>V488I + D116E</i>	1	10	0,045

and the following parameters: 95°C for 15 min, 35 cycles at 95°C for 15 sec, 55°C for 15 sec, 72°C for 30 sec; 72°C for 7 min. The products were further purified using the BigDye Xterminator Purification Kit (Applied Biosystems); the Applied Biosystems 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems) was used for sequencing.

Microsoft Excel, SciPy [15], Matplotlib [16] software was used for the statistical analysis and data visualization. The significance of differences between groups was assessed using Fisher's exact test for categorical variables and the Mann-Whitney U test for continuous variables. The significance level for the statistical hypothesis test was set at $p < 0.05$, the value universally practiced in medical research. The strength of relationships between variables was measured using the Pearson correlation coefficient.

Results

The study showed that 7 (70%) *C. albicans* strains had 5 mutations in the *ERG11* gene, which were identified as *E266D*, *G464S*, *I471L*, *D116E*, and *V488I*. The highest frequency of occurrence was demonstrated by the *E266D* mutation, while the *I471L* mutation was detected most rarely (**Table 1**). The total number of mutations was 13.

Compound, two-component mutations were carried by 6 (92.3%) strains (**Table 2**). The highest tendency toward forming compound mutations was demonstrated by *E266D* and *V488I* – 3 (30%) mutations in each. No noticeable association between mutations was observed — the correlation coefficient was 0.410 or lower.

Overexpression of the *ERG11* gene was detected in 60% of the tested *C. albicans* strains. The detected mutations occurred much more frequently in strains with overexpression of the above gene (**Table 3**). In the meantime, the statistical analysis did not reveal

any significant associations between them. At the same time, the *V488I* mutation demonstrated a strong negative relationship with the overexpression of the *ERG11* gene ($r = -0.845$; $p < 0.05$).

The results of the analysis of the association between the mutations and the sensitivity to antimycotic agents are presented in **Table 4**, showing that MIC in strains carrying some mutation was approximately equal to or significantly lower than MIC in strains without mutations. The noticeably significant difference was demonstrated by the sensitivity to azole antimycotics, MIC of which was 100 times lower in mutation carriers ($p < 0.05$) compared to the strains without mutations.

Among triazoles, significant differences were demonstrated by posaconazole and itraconazole, MIC of which in mutation carriers was 100 times as low ($p < 0.05$) as MIC in strains without mutations in the *ERG11* gene. Furthermore, MIC of these agents was on average 16.5 times as low as MIC of voriconazole and fluconazole ($p < 0.001$). Among the detected mutations, the *G464S* mutation deserves close attention: In its carriers, MIC of triazoles decreased less significantly than with other mutations ($p < 0.05$). The correlation analysis did not reveal any relationship between the chemical structure and molecular weight of the triazole agent and the presence of mutations.

The presence of mutations in the *ERG11* gene did not have any significant effect on MICs of the tested echinocandins, amphotericin B, and 5-flucytosine. However, in carriers of the *G464S* mutation, MICs of anidulafungin, caspofungin, and amphotericin B tended to shift insignificantly towards resistance ($p > 0.05$).

Discussion

During our molecular and genetic study of *C. albicans* strains that were inherently resistant to fluconazole and voriconazole, we detected high occurrence of overexpression of the *ERG11* gene as well as a number of mutations in the above gene: *D116E*, *E266D*, *G464S*, *I471L*, and *V488I*. The *E266D* mutation was most frequently detected in our subset of *C. albicans*. The above mutations were described previously; however, they are not ubiquitous [17–26]. Since all strains were viable, we concluded that the location of these mutations did

not affect critical regions of the genome, and they were not lethal.

Hypothetically, the gene overexpression must create favorable conditions for mutation or recombination process. However, as our findings show, the mutations in the *ERG11* gene are not associated with its overexpression. Moreover, in most cases, the overexpression of the gene and its *V488I* mutation occurred discordantly. We can assume that the occurrence of the *V488I* mutation disables the ability of the gene to multiply.

One of the characteristics of the detected mutations was their co-occurrence. The co-occurrence of *E266D* and *G464S* mutations was previously described by researchers from China, the United States, and some other countries [7, 20, 25, 27–30]. In the meantime, based on the low likelihood of the linkage between individual mutations, the above co-occurrence should be seen as a random event. It means that, most likely, mutations are not linked with each other, i.e. they emerge independently in various regions of the gene, and their location does not depend on anything.

The continuous use of azole agents in treatment of HIV-infected patients with oropharyngeal candidiasis puts strong pressure on the *C. albicans* population, which starts accumulating resistant strains, including strains with overexpression of the *ERG11* gene. Functionally, this mechanism promotes the synthesis of the azole target. At the same time, nonsynonymous mutations in the *ERG11* gene lead to modification of the target molecule and, consequently, to altered affinity of antifungal agents to their target [21]. As a result, the effects of gene overexpression are reduced. This phenomenon was pointed out when strains with mutations *D116E*, *G464S*, and *E266D* were studied [5–7, 9, 10, 17, 22, 24, 31–36]; these mutations were found to be associated with a manifold increase in MIC of azole agents. At the same time, the *V488I* mutation as well as *E266D* and *D116E*, as demonstrated by some studied, remained neutral and had no effect on MIC [4–6, 9, 32, 37]. It is believed that this mechanism may remain idle if overexpression of the *ERG11* gene is absent [20].

Compared to studies of other researchers cited above, all the mutations detected in our study were associated with increased sensitivity to triazole agents

Table 3. Association of mutations in the *ERG11* gene with its hyperexpression

Mutation	Strains with overexpression of the gene		Strains without overexpression of the gene		Association coefficient
	abs.	%	abs.	%	
<i>E266D</i>	3	75,0	1	25,0	0,251
<i>G464S</i>	1	50,0	1	50,0	0,457
<i>I471L</i>	1	100,0	0	0,0	–
<i>D116E</i>	2	66,7	1	33,3	0,094
<i>V488I</i>	1	33,3	2	66,7	–0,845
The sum	8	61,5	5	38,5	0,089
Combined	4	66,7	2	33,3	0,251

Table 4. Relationship of mutations in the *ERG11* gene with the sensitivity of *C. albicans* to antimycotic drugs

Mutation	<i>n</i>	Anidulafungin	Micafungin	Caspofungin	Posaconazole	Voriconazole	Itraconazole	Fluconazole	Amphotericin B	5-Flucytosine
The sum	+ 12	0,03 ± 0,003	0,012 ± 0,001	0,08 ± 0,009	0,043 ± 0,019	1,083 ± 0,393	0,082 ± 0,038	33,333 ± 10,130	0,708 ± 0,074	0,065 ± 0,005
<i>E266D</i>	- 28	0,041 ± 0,003	0,013 ± 0,001	0,086 ± 0,006	3,471 ± 1,117	4,036 ± 1,067	6,941 ± 2,234	98,857 ± 20,285	0,768 ± 0,048	0,066 ± 0,004
<i>G464S</i>	+ 4	0,026 ± 0,004	0,012 ± 0,002	0,075 ± 0,015	0,023 ± 0,004	1,375 ± 0,875	0,038 ± 0,008	28,00 ± 12,000	0,75 ± 0,144	0,06 ± 0,000
	- 6	0,045 ± 0,007	0,013 ± 0,001	0,09 ± 0,013	4,057 ± 2,716	4,333 ± 2,635	8,113 ± 5,432	113,333 ± 48,637	0,75 ± 0,112	0,07 ± 0,010
<i>G464S</i>	+ 2	0,045 ± 0,015	0,012 ± 0,004	0,12 ± 0,000	0,133 ± 0,118	2,25 ± 1,750	0,265 ± 0,235	96,00 ± 32,000	1,00 ± 0,000	0,06 ± 0,000
	- 8	0,036 ± 0,006	0,012 ± 0,001	0,075 ± 0,010	3,021 ± 2,100	3,375 ± 2,028	6,038 ± 4,201	75,00 ± 39,509	0,688 ± 0,091	0,068 ± 0,007
<i>D116E</i>	+ 3	0,025 ± 0,005	0,01 ± 0,002	0,06 ± 0,000	0,03 ± 0,000	0,50 ± 0,000	0,05 ± 0,010	16,00 ± 0,000	0,667 ± 0,167	0,06 ± 0,000
	- 7	0,043 ± 0,006	0,013 ± 0,001	0,094 ± 0,012	3,477 ± 2,368	4,286 ± 2,228	6,954 ± 4,735	106,286 ± 41,705	0,786 ± 0,101	0,069 ± 0,009
<i>V488I</i>	+ 3	0,03 ± 0,000	0,013 ± 0,002	0,08 ± 0,020	0,025 ± 0,005	0,50 ± 0,000	0,05 ± 0,010	16,00 ± 0,000	0,50 ± 0,000	0,08 ± 0,020
	- 7	0,041 ± 0,007	0,012 ± 0,001	0,086 ± 0,012	3,479 ± 2,367	4,286 ± 2,228	6,954 ± 4,735	106,286 ± 41,705	0,857 ± 0,092	0,06 ± 0,000

Note. "+" — mutation is present, "-" — mutation is absent.

unlike the strains without mutations, though the tested *C. albicans* strains were resistant. Only the *G464S* mutation was slightly slow in manifestation of these properties. It can be assumed that the detected mutations significantly affected the structure of the site of interaction between the target molecule and triazoles, which reduced their affinity. At the same time, we did not find any association between MIC in mutant strains and the chemical structure of the therapeutic agent, though overexpression of the *ERG11* gene was more efficient against short-chain azoles [3]. The detected mutations had no effect on the sensitivity of the tested strains to echinocandins, amphotericin B, and 5-flucytosine.

In our study, mutant *C. albicans* strains showed higher sensitivity to itraconazole and posaconazole than to voriconazole and fluconazole. This difference may be associated with the rare administration of the first two drugs for treatment of HIV-infected patients and with the targeted selection of strains by their resistance to the last two drugs.

Thus, most of the studied *C. albicans* strains, which are resistant to fluconazole and voriconazole, had mutations in the *ERG11* gene: *D116E*, *E266D*, *G464S*, *I471L*, and *V488I*, which, except for the *V488I* mutation, are not associated with the overexpression of the above gene. The detected mutations decreased the effects of *ERG11* gene overexpression up to 100 times, though they did not eliminate the inherent resistance to triazole antimycotics and did not affect the sensitivity to echinocandins, amphotericin B, and 5-flucytosine.

It should be remembered that the studied strains were isolated from HIV-infected patients – permanent residents of Moscow. Therefore, the obtained results should be interpreted taking into account the specific features of the Moscow Region. The absence of any firm conclusion about the effects of *ERG11* gene mutations necessitates further research, including clinical studies.

Conclusions

1. *D116E*, *E266D*, *G464S*, *I471L*, and *V488I* mutations are detected in the *ERG11* gene in *C. albicans* strains isolated from HIV-infected patients – residents of Moscow.

2. Except for *V488I*, the detected mutations do not have any association with the *ERG11* gene overexpression.

3. *C. albicans* strains – mutation carriers – were up to 100 times more sensitive to triazole antimycotics. The presence of mutations had no effect on the sensitivity to echinocandins, polyene, and pyrimidine.

REFERENCES

1. Enoch D.A., Yang H., Aliyu S.H., Micallef C. The changing epidemiology of invasive fungal infections. *Methods Mol. Biol.* 2017;1508:17–65.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6515-1_2

2. Pfaller M.A., Diekema D.J., Gibbs D.L., et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(4):1366–77. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.02117-09>
3. Biswas C., Chen S.C., Halliday C., et al. Identification of genetic markers of resistance to echinocandins, azoles and 5-fluorocytosine in *Candida glabrata* by next-generation sequencing: a feasibility study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2017;23(9):676.e7–e.10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.014>
4. Sanguinetti M., Posteraro B., Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses.* 2015;58(Suppl. 2):2–13. DOI: <https://doi.org/10.1111/myc.12330>
5. Godinho C.P., Sá-Correia I. Physiological Genomics of Multistress Resistance in the Yeast Cell Model and Factory: Focus on MDR/MXR Transporters Progress in Molecular and Subcellular Biology. *Cham;* 2019:1–35.
6. Castanheira M., Deshpande L.M., Messer S.A., et al. Analysis of global antifungal surveillance results reveals predominance of Erg11 Y132F alteration among azole-resistant *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* and country-specific isolate dissemination. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020;55(1):105799. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.09.003>
7. Cernicka J., Subik J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006;27(5):403–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.12.005>
8. Lim H.J., Shin J.H., Kim M.N., et al. Evaluation of two commercial broth microdilution methods using different interpretive criteria for the detection of molecular mechanisms of acquired azole and echinocandin resistance in four common *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2020;64(11):e00740-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00740-20>
9. Lopes W., Vainstein M.H., Schrank A. Revealing colonial characteristics of *Candida tropicalis* by high-resolution scanning electron microscopy. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019;25(2):188–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.032>
10. Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D.R., et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2016;62(4):e1–50. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
11. Bertout S., Dunyach C., Drakulovski P., et al. Comparison of the Sensititre YeastOne® dilution method with the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 microbroth dilution reference method for determining MIC of eight antifungal agents on 102 yeast strains. *Pathol. Biol. (Paris).* 2011;59(1):48–51. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2010.07.020>
12. Sanguinetti M., Posteraro B. Susceptibility testing of fungi to antifungal drugs. *J. Fungi. (Basel).* 2018;4(3):110. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof4030110>
13. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta-Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
14. Men A., Wilson P., Siemering K., Forrest S. *Sanger DNA Sequencing.* Weinheim; 2008:1–11.
15. Virtanen P., Gommers R., Oliphant T.E., et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat. Methods.* 2020;17(3):261–72. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
16. Hunter J.D. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comput. Sci. Eng.* 2007;9(3):90–5. DOI: <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.55>
17. Xu Y., Chen L., Li C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* *ERG11* mutations. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008;61(4):798–804. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkn015>
18. Chau A.S., Mendrick C.A., Sabatelli F.J., et al. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(6):2124–31. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.48.6.2124-2131.2004>
19. Favre B., Didmon M., Ryder N.S. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 α -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading).* 1999;145(Pt. 10):2715–25. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2715>
20. Flowers S.A., Colón B., Whaley S.G., et al. Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59(1):450–60. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.03470-14>
21. Goldman G.H., da Silva Ferreira M.E., dos Reis Marques E., et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004;50(1):25–32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.04.009>
22. Kakeya H., Miyazaki Y., Miyazaki H., et al. Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44(11):2985–90. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.44.11.2985-2990.2000>
23. Kelly S.L., Lamb D.C., Kelly D.E. Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999;180(2):171–5. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08792.x>
24. Perea S., López-Ribot J.L., Kirkpatrick W.R., et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45(10):2676–84. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.45.10.2676-2684.2001>
25. Sanglard D., Ischer F., Koymans L., et al. Amino acid substitutions in the cytochrome p-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42(2):241–53. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.42.2.241>
26. Xiang M.J., Liu J.Y., Ni P.H., et al. Erg11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2013;13(4):386–93. DOI: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12042>
27. Franz R., Kelly S.L., Lamb D.C., et al. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42(12):3065–72. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.42.12.3065>
28. Li X., Brown N., Chau A.S., et al. Changes in susceptibility to posaconazole in clinical isolates of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004;53(1):74–80. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkh027>
29. Marichal P., Koymans L., Willemsens S., et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading).* 1999;145(Pt. 10):2701–13. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2701>
30. Kelly S.L., Lamb D.C., Loeffler J., et al. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;262(1):174–9. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1136>
31. Favre B., Ryder N.S., Didmon M. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 α -demethylase contribute to azole resistance

- in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)*. 1999;145(Pt. 10): 2715–25.
DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2715>
32. Finkina E.I., Bogdanov I.V., Ignatova A.A., et al. Antifungal activity, structural stability, and immunomodulatory effects on human immune cells of defensin from the lentil *Lens culinaris*. *Membranes (Basel)*. 2022;12(9):855.
DOI: <https://doi.org/10.3390/membranes12090855>
33. Lee Y., Puumala E., Robbins N., Cowen L.E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem. Rev.* 2020;121(6):3390–411.
DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199>
34. Whaley S.G., Berkow E.L., Rybak J.M., et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. *Front. Microbiol.* 2017;7:2173.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>
35. White P.L., Price J.S., Cordey A., Backx M. Molecular diagnosis of yeast infections. *Curr. Fungal Infection Rep.* 2021;15(3):67–80.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12281-021-00421-x>
36. Ruhnke M., Eigler A., Tennagen I., et al. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 1994;32(9):2092–8.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.32.9.2092-2098.1994>
37. Gabaldón T., Fairhead C. Genomes shed light on the secret life of *Candida glabrata*: not so asexual, not so commensal. *Curr. Genet.* 2019;65(1):93–8.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0867-z>

Information about the authors

Yuri V. Nesvizhsky — D. Sci. (Med.), Professor, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia; chief researcher, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, nesviz@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0386-3883>

Stanislav S. Afanasiev — D. Sci. (Med.), Professor, main researcher, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>

Alexander D. Voropaev — postgraduate student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6431-811X>

Yulia N. Urban — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of clinical microbiology and biotechnology, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0189-3608>

Mariam E. Suleimanova — resident, Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9255-6481>

Maxim S. Afanasiev — D. Sci. (Med.), Professor, Chair of clinical allergology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5860-4152>

Elena V. Budanova — Cand. Sci. (Med.), Associated professor, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1864-5635>

Elena A. Voropaeva — D. Sci. (Biol.), G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0463-0136>

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 23.05.2023;
accepted for publication 12.07.2023;
published 28.08.2023

Информация об авторах

Несвижский Юрий Владимирович — д.м.н., профессор, профессор каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия; г.н.с. МНИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, nesviz@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0386-3883>

Афанасьев Станислав Степанович — д.м.н., профессор, г.н.с. МНИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>

Воропаев Александр Дмитриевич — аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6431-811X>

Урбан Юлия Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаб. клинической микробиологии и биотехнологии МНИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0189-3608>

Сулейманова Марьям Эмильевна — ординатор, Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9255-6481>

Афанасьев Максим Станиславович — д.м.н., проф. каф. клинической аллергологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5860-4152>

Буданова Елена Вячеславовна — к.м.н., доцент, доцент каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1864-5635>

Воропаева Елена Александровна — д.м.н., г.н.с. МНИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0463-0136>

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 23.05.2023;
принята к публикации 12.07.2023;
опубликована 28.08.2023



Оценка изменений фенотипа, интенсивности дегрануляции, гибели и лизиса нейтрофилов при моделировании *ex vivo* стафилококковой бактериемии

Кравцов А.Л.[✉], Бугоркова С.А., Ключева С.Н., Шмелькова Т.П., Кожевников В.А.

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Аннотация

Введение. В настоящее время актуальным является изучение взаимодействия *Staphylococcus aureus* с клетками врождённого иммунитета человека в условиях моделирования бактериемии *ex vivo*, а не только в опытах с предварительно выделенными из крови фагоцитами.

Цель: сравнительная оценка изменений фенотипа, интенсивности азурофильной дегрануляции, гибели и лизиса нейтрофилов в образцах цельной крови от условно здоровых доноров при добавлении живых и убитых микробных клеток *S. aureus* ATCC 6538 (209-P).

Материалы и методы. Бактериемию моделировали добавлением микробов в цельную кровь (с гепарином) в дозах 10^8 – 10^1 м.к./мл. Бактерицидный эффект определяли в различные сроки инкубации крови при 37°C (в течение 6 ч) микробиологическим методом. С помощью проточной цитометрии в крови проводили по протоколу Lyse/No-Wash иммунофенотипирование лейкоцитов для определения на поверхности нейтрофильных гранулоцитов (НГ) экспрессии маркеров азурофильной дегрануляции (CD63), раннего апоптоза (CD95) и клеточной адгезии (CD62L), а также для оценки плотности поверхностной экспрессии молекулярного триггера нетоза Fc γ RIIIb (CD16) и тирозиновой протеинфосфатазы (CD45), являющейся регулятором FcR-опосредованной передачи клеточных сигналов при фагоцитозе и нетозе. Наличие дегенеративных изменений в НГ подтверждали с помощью микроскопии при анализе мазков крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе.

Результаты. Выявлены выраженные различия в реакции НГ крови человека на живые и убитые клетки *S. aureus* по исследуемым фенотипическим показателям. Только живые микробы запускали в НГ азурофильную дегрануляцию и стимулировали, начиная с 2 ч, появление в крови большого числа НГ с фенотипом CD95⁺. Кроме того, живые бактерии вызывали в фагоцитах вдвое более интенсивную функциональную перестройку по экспрессии CD45. Они индуцировали быстрое снижение плотности экспрессии CD16 на НГ и активировали в крови лизис НГ с интенсивностью, зависящей от исходной микробной концентрации. При концентрациях более 10^5 м.к./мл с помощью технологии проточной цитометрии регистрировали через 6 ч присутствие в крови характерной для сепсиса популяции нейтрофилов низкой плотности (с фенотипом CD63⁺CD16^{low}), склонных к спонтанному аутолизису (нетозу).

Заключение. В условиях моделирования бактериемии *ex vivo* оценены различные стратегии нейтрофилов крови человека в реализации механизмов защиты макроорганизма от инфекции и определена перспектива применения полученных сведений для выявления лиц с высоким риском развития стафилококкового сепсиса.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, модель бактериемии *ex vivo*, фагоцитоз, азурофильная дегрануляция нейтрофилов, апоптоз, нетоз, вторичный некроз, иммунофенотипирование лейкоцитов, проточная цитометрия

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (протокол № 15 от 10.11.2021).

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках темы НИР АААА-А21-121012090064-0.

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

Для цитирования: Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.Н., Шмелькова Т.П., Кожевников В.А. Оценка изменений фенотипа, интенсивности дегрануляции, гибели и лизиса нейтрофилов при моделировании *ex vivo* стафилококковой бактериемии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):293–305. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-384>
EDN: <https://www.elibrary.ru/qgughr>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-384>

Assessment of changes in the phenotype, intensity of degranulation, death and lysis of neutrophils in *ex vivo* modeling of *Staphylococcal* bacteremia

Aleksandr L. Kravtsov[✉], Svetlana A. Bugorkova, Svetlana N. Klyueva, Tatiana P. Shmelkova, Vitaly A. Kozhevnikov

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia

Abstract

Introduction. At present, it is important to study the interaction of *Staphylococcus aureus* with human innate immunity cells under conditions of *ex vivo* bacteremia modeling, but not only in experiments with phagocytes previously isolated from the blood.

Purpose: comparative assessment of changes in the phenotype, intensity of azurophilic degranulation, death and lysis of neutrophils in whole blood samples from apparently healthy donors following the addition of live and killed microbial cells of *S. aureus* ATCC 6538 (209-P).

Materials and methods. Bacteremia was modeled by adding microbes to whole blood (with heparin) at doses ranging from 10^8 to 10^1 mc/ml. The bactericidal effect was determined at different time points of blood incubation at 37°C (for 6 hours) by the microbiological method. The blood leukocyte immunophenotyping was performed using flow cytometry according to the Lyse/No-Wash protocol to determine the expression of markers of azurophilic degranulation (CD63), early apoptosis (CD95) on the surface of neutrophilic granulocytes (NG) and cell adhesion (CD62L), as well as to assess the surface expression density of the molecular trigger of netosis Fc γ RIIIb (CD16) and tyrosine protein phosphatase (CD45), which is a regulator of FcR-mediated cell signaling during phagocytosis and netosis. The presence of degenerative changes in NG was confirmed by microscopy in the analysis of blood smears stained according to Romanovsky–Giemsa.

Results. Significant differences were revealed in the response of human blood NG to live and killed *S. aureus* cells according to the studied phenotypic parameters. Only live microbes triggered azurophilic degranulation in NCs and stimulated, starting from 2 h incubation, the appearance of a large number of NG with the CD95⁺ phenotype in the blood. In addition, live bacteria induced in phagocytes twice as much functional rearrangement in terms of CD45 expression. They induced a rapid decrease in the density of CD16 expression on NG and activated NG lysis in the blood with an intensity depending on the initial microbial concentration. Following 6 h incubation at concentrations of more than 10^5 mc/ml, flow cytometry detected the presence in the blood of a population of low density neutrophils characteristic of sepsis (Low Density Neutrophils — with the CD63⁺CD16^{low} phenotype), whose cells are prone to spontaneous autolysis (netosis).

Conclusion. Under the conditions of *ex vivo* modeling of bacteremia, various strategies of human blood neutrophils in the implementation of the mechanisms of protection of the macroorganism from infection were evaluated, and the prospects of using the obtained information to identify individuals at high risk of developing staphylococcal sepsis were determined.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *ex vivo* model of bacteremia, phagocytosis, azurophilic degranulation of neutrophils, apoptosis, netosis, secondary necrosis, leukocyte immunophenotyping, flow cytometry

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" (protocol No. 15, November 10, 2021).

Acknowledgments. The study was supported by budget funding within the framework of the research topic No AAAA-A21-121012090064-0.

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: Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Shmelkova T.P., Kozhevnikov V.A. Assessment of changes in the phenotype, intensity of degranulation, death and lysis of neutrophils in *ex vivo* modeling of *Staphylococcal* bacteremia. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(4):293–305.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-384>

EDN: <https://www.elibrary.ru/qgughr>

Введение

Актуальной проблемой медицины по-прежнему является сепсис — тяжёлое патологическое состояние, сопровождающееся нахождением различного рода патогенов (бактерии, вирусы или грибы) в крови. При критически тяжёлой форме проявления сепсиса (септический шок) диссеминированное внутрисосудистое свёртывание крови приводит к смерти каждого второго пациента в результате формирования полиорганной недостаточности на фоне прогрессирующих нарушений в системе гемостаза [1]. Однако единой патофизиологической концепции септического шока не существует, что объясняют недостаточной изученностью сложных молекулярных механизмов развития синдрома системного воспалительного ответа [2, 3], в том числе различных механизмов программируемой клеточной гибели (апоптоз, нетоз, некроптоз и др.), используемых нейтрофильными гранулоцитами (НГ) периферической крови для защиты от патогенных микроорганизмов и имеющих первостепенное значение для разрешения воспаления [4].

Моделировать синдром системного воспалительного ответа можно «в стерильных условиях» путём введения животным гепарансульфата, который является мощным эндогенным триггером воспаления, высвобождаемым из внеклеточного матрикса эндотелия сосудов под влиянием протеолитического эффекта лейкоцитарной эластазы, или непосредственно лейкоцитарной эластазы [5]. С другой стороны, синдром системного воспалительного ответа индуцируют патогенные микроорганизмы и/или их структурные компоненты, способные запускать в организме процессы массивной секреторной дегрануляции, гибели и лизиса нейтрофилов периферической крови с высвобождением из первичных гранул этих клеток огромного количества молекул лейкоцитарной эластазы в плазму [6, 7], что при инфекциях может играть решающую роль в развитии синдрома диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови и септического шока [8, 9].

Циркуляция бактерий в кровяном русле без клинических симптомов обозначается как бактериемия, которая является вероятным, но не обязательным диагностическим признаком сепсиса [10, 11]. Однако в крови больных сепсисом обязательно отмечается специфическая реакция НГ в виде появления особой популяции НГ низкой плотности (low density neutrophils — LDNs) [12], клетки которой характеризуются сниженной степенью гранулярности цитоплазмы в результате развития в них интенсивной азурофильной дегрануляции, имеют провоспалительный (пронетотический) фенотип и склонны к спонтанному аутолизису (нетозу) [13, 14]. Присутствие LDNs, большого числа нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps — NETs) и молекул лейкоцитарной эластазы

в периферической крови пациентов коррелирует с гиперкоагуляцией и развитием тяжёлых форм бактериального или вирусного сепсиса [7, 9, 12, 15].

Для прогнозирования инфекционных осложнений по появлению и увеличению количества в крови клеток популяции LDNs с изменёнными фенотипическими свойствами (экспрессия CD63 и как минимум вдвое сниженный уровень экспрессии CD16) в последние годы применяется технология импульсной проточной цитометрии [13, 14]. По нашим данным, при иммунофенотипировании лейкоцитов по протоколу Lyse/No Wash цитометрический анализ позволяет не только количественно оценивать в микрообъёмах цельной крови пациентов изменения фенотипа и дегрануляцию нейтрофилов, но и контролировать интенсивность процесса лейкоцитолита [16]. Однако на модели бактериемии *ex vivo* с использованием живых инфекционных агентов, являющихся наиболее эффективными индукторами нетоза и защитной воспалительной реакции, такие исследования не проводились.

Целью настоящей работы явилась сравнительная оценка изменений фенотипа, а также интенсивности азурофильной дегрануляции, гибели и лизиса нейтрофилов, в образцах цельной крови от условно здоровых доноров при добавлении живых и убитых микробных клеток *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P).

Материалы и методы

В исследованиях использовали тест-штамм *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) из Государственной коллекции патогенных бактерий (Российский противочумный институт «Микроб»). Суточные культуры *S. aureus* выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2) и в стерильном фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) с 0,9% NaCl готовили по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-59-85П взвеси живых бактерий с концентрацией 10^9 м.к./мл, из которых путём последовательного разведения 0,9% NaCl получали микробные взвеси более низкой концентрации 10^8 – 10^2 м.к./мл. Для получения взвесей убитых бактерий живые микробы обеззараживали в течение 80 мин нагреванием на водяной бане при 60°C [17].

Для опытов *ex vivo* кровь получали из локтевой вены 10 условно здоровых добровольцев мужского и женского пола в возрасте 23–30 лет на основании оформленного добровольного информированного согласия. Кровь забирали в объёме 5–9 мл в пробирки с антикоагулянтом (гепарином) и использовали в течение 1–2 ч. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (протокол № 15 от 10.11.2021).

Для моделирования бактериемии на 1 мл крови, содержащий в среднем около 2×10^6 фагоцитов, добавляли 100 мкл исследуемой взвеси бактерий. Для взвесей с концентрацией от 10^9 – 10^2 м.к./мл 0,9% NaCl это соответствовало концентрациям 10^8 – 10^1 м.к./мл крови или исходным микробным нагрузкам (числу бактерий : фагоцит), равным в среднем около 50 : 1, 5 : 1, 1 : 2, 1 : 20, 1 : 200, 1 : 2000, 1 : 20 000, 1 : 200 000.

Сравнительную оценку исследуемых в работе показателей проводили в условиях добавления в кровь живых или убитых бактерий в основном при микробной нагрузке 50 : 1, обычно используемой для оценки *in vitro* фагоцитарной активности гранулоцитов крови человека по отношению к *S. aureus* [17]. Кровь с бактериями помещали в термостат с температурой 37°C и инкубировали при перемешивании на шуттель-аппарате в течение 6 ч. Контролем служили образцы, инкубируемые в течение 6 ч без бактерий, в которые добавляли по 100 мкл стерильного 0,9% NaCl на 1 мл крови [18].

Имунофенотипирование лейкоцитов в исследуемых образцах крови для проточно-цитофлуориметрического анализа осуществляли по протоколу Lyse/No-Wash¹ с использованием меченых мышиных моноклональных антител к антигенам лейкоцитов крови человека («Becton Dickinson»): CD45-FITC, CD63-PE, CD62L-ECD, CD45-PC5, CD16-FITC, CD95-PE, CD38-APC. Гранулоциты идентифицировали по степени их внутриклеточной гранулярности (интенсивности бокового светорассеяния) и по экспрессии общего лейкоцитарного антигена (CD45). В гейте гранулоцитов НГ подсчитывали как фагоциты с высокой экспрессией Fc γ R IIb (CD16) на клеточной поверхности [14]. Изменения в плотности экспрессии CD45 и CD16 на клетку регистрировали в неоднородных популяциях нейтрофилов крови как повышение (или снижение) среднего значения интенсивности клеточной флуоресценции (mean fluorescence intensity — MFI), количественно измеряемой в условных единицах (каналах цитометра) [16]. Кроме того, в крови определяли относительное содержание НГ, положительных по экспрессии поверхностных маркеров азурофильной дегрануляции (CD63⁺), раннего апоптоза (CD95⁺) и клеточной адгезии (CD62L⁺) [19]. Результаты иммунофенотипирования учитывали для каждого опытного и контрольного образца крови в динамике: через 30 мин, 1, 2, 4, 6 ч инкубации. В гейте лимфоцитов через 6 ч определяли долю активированных иммунокомпетентных клеток, имеющих фенотип CD38⁺.

Количество в крови живых клеток *S. aureus* устанавливали на каждый срок микробиологическим методом [17], основанным на смешивании 10 мкл крови с 1 мл дистиллированной воды для осмотического лизиса в течение 30 с лейкоцитов и эритроцитов. Из смеси готовили через 30 с последовательные десятикратные разведения в 0,9% NaCl клеточных лизатов, содержащих бактерии и разведённую водой плазму, для высева на чашки с агаром Хоттингера (pH 7,2) и подсчёта через сутки в каждом из этих высевах числа выросших колоний стафилококка (КОЕ). Определяли долю выживших в крови бактерий в различные сроки инкубации для оценки интенсивности и динамики развития *ex vivo* бактерицидного эффекта. Способность стафилококка выживать в крови в зависимости от исходной микробной концентрации оценивали по наличию (или отсутствию) КОЕ через 6 ч инкубации.

Активацию внутриклеточного кислородзависимого метаболизма в НГ регистрировали с использованием изначально нефлуоресцирующего красителя дихлорофлуоресцеина диацетата, который, пассивно проникая в клетки, превращается в накапливающееся в цитоплазме флуоресцирующее соединение под влиянием образующейся при «кислородном взрыве» перекиси водорода. Реакцию ставили в опытах с кровью, обсеменённой *S. aureus*, путём смешивания её с рабочим раствором дихлорофлуоресцеина диацетата (10 мкМ). Образцы инкубировали 30 мин при 37°C. По окончании инкубации проводили лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов в FACS Lysing Solution («BD Biosciences»). Результат учитывали, измеряя методом проточной цитометрии в гейте гранулоцитов MFI в зелёной области спектра. Степень стимуляции фагоцитов по уровню генерации активных форм кислорода выражали в сравнении с контролем в виде коэффициента стимуляции [20]. Функциональную неоднородность популяции гранулоцитов по исследуемому показателю характеризовали значением коэффициента вариации (%).

Дегрануляцию нейтрофилов оценивали по поверхностной экспрессии клетками фенотипического маркера азурофильной дегрануляции CD63 [13] и по снижению показателя внутриклеточной гранулярности (бокового светорассеяния) [16]. Кроме того, с 30-минутным интервалом контролировали в течение 6 ч состояние мембран лизосомальных гранул фагоцитов с помощью суправитальной окраски клеток в образцах цельной крови флуорохромом акридиновым оранжевым [21]. Нарушение стабильности в НГ первичных (бактерицидных) гранул, несущих активность ферментов эластазы и миелопероксидазы, регистрировали методом проточной цитофлуориметрии как утрату способности этих гранул аккумулировать в цитоплазме большое количество молекул акридинового оранжевого, флуоресцирующих в красной области спектра [22, 23].

¹ BD Bioscience Resources and Tools. Stain Lyse No Wash. Direct Immunofluorescence Staining of Whole Blood using a Lyse/No-Wash Procedure. Available at: <https://www.bdbiosciences.com/en-no/resources/protocols/stain-lyse-no-wash>

Интенсивность лизиса нейтрофилов количественно оценивали методом проточной цитометрии по снижению относительного количества гранулоцитов в образцах цельной периферической крови, а также по сопутствующему ему увеличению доли в суммарной лейкоцитарной популяции разрушенных фагоцитов, регистрируемых цитометром в области клеточного дедбриса [16]. Данные об интенсивности лейкоцитолитического и содержания в крови через 6 ч инкубации LDNs с пронетотическим фенотипом (CD16^{low} [13, 14]) сопоставляли при различных исходных микробных нагрузках с результатами микробиологического анализа.

Наличие в клетках дегенеративных изменений подтверждали путём исследования фиксированных 96% этанолом и окрашенных по Романовскому–Гимзе мазков крови на микроскопе «Olympus CX41» («Olympus») с цифровой камерой «VZ-C31S» («VideoZavr») в программе «VideoZavr v. 1.5». Индексы дегенерации нейтрофилов оценивали как долю НГ с морфологическими признаками нетоза и/или некроптоза при микроскопическом анализе около 200 отдельных лейкоцитов. Детекцию эритроцитов с изменённой клеточной морфологией проводили в 5 полях зрения, где учитывали результаты анализа не менее 600 клеточных элементов [24].

Для оценки показателей светорассеяния и MFI меченных CD-маркерами лейкоцитов крови в работе использовали проточный цитометр «DakoCytometry» с программным обеспечением «Summit v.4.3 Built 2445» [16]. Эксперименты с лейкоцитами, окрашенными в крови флуорохромом акридиновым оранжевым, проводили на двухканальном ламповом проточном цитофлуориметре «ICP22 RHYWE», не имеющем каналов светорассеяния [23].

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывали с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica 10.0» («StatSoft Inc.»). Их пред-

ставляли в виде медианы (Me) и квартильных отклонений ($Q_{25}-Q_{75}$) с расчётом достоверности различий в исследуемых группах с использованием U-критерия Манна–Уитни. Связи между показателями оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Значение $p < 0,05$ считали статистически значимым.

Результаты

При отсутствии в крови бактерий в среднем около 10% гранулоцитов спонтанно генерировало активные формы кислорода в системе НАДФН-оксидазы. Живые и убитые клетки исследуемого штамма *S. aureus*, попадая в кровь, стимулировали через 30 мин кислородзависимый метаболизм около 70 и 90% гранулоцитов соответственно. Вариация интенсивности функциональной активации отдельных фагоцитов по уровню продукции активных форм кислорода была при этом вдвое выше в ответ на живые, чем на убитые клетки *S. aureus* (табл. 1).

При контакте в крови с живыми бактериями на поверхности НГ уже через 30 мин в 4,3 раза повышалась и сохранялась повышенной в течение 6 ч плотность экспрессии тирозиновой протеинфосфатазы (общего лейкоцитарного антигена CD45), в то время как убитые микробы индуцировали повышение поверхностной экспрессии CD45 только в 2,2 раза (табл. 2). Функциональная активация клеток врождённого иммунитета в опытных образцах крови по данному параметру выглядела в сравнении с контролем как смещение популяции гранулоцитов (региона R8 на цитограмме б; рис. 1) вправо по оси абсцисс — в область более высоких значений плотности экспрессии антигена CD45, характерных для лимфоцитов периферической крови. Кроме того, через 30 мин в крови, обсеменённой живыми и убитыми клетками *S. aureus*, увеличивалась на 15% плотность экспрессии Fc γ R IIIb (CD16) на НГ и снижалась доля нейтрофилов с фенотипом CD62L⁺ в среднем на 22% (табл. 2).

Таблица 1. Показатели индуцированного бактериями кислородзависимого метаболизма НГ в крови, обсеменённой живыми и убитыми клетками *S. aureus*, в сравнении с показателями спонтанной реакции в контроле, Me ($Q_{25}-Q_{75}$)

Table 1. Indicators of neutrophilic granulocyte bacteria-induced oxygen-dependent metabolism in blood contaminated with live and dead *Staphylococcus aureus* cells in comparison with indicators of spontaneous reaction in control, Me ($Q_{25}-Q_{75}$)

Группа Group	Тип реакции Type of reaction	Активность, % Activity, %	Интенсивность, усл. ед. Intensity, rel. units	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, %	Индекс стимуляции, усл. ед. Index of stimulation, rel. units
Контроль Control	Спонтанная Spontaneous	9,8 (6–13)	23 (18–26)	19 (17–23)	–
Живые клетки Live cells	Индукционная Induced	68 (61–75)**	97 (90–110)*	47 (39–50)**	6,8
Убитые клетки Dead cells	Индукционная Induced	91 (85–94)*	88 (83–102)*	24 (18–30)	9,1

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** $p < 0,05$ по сравнению с убитыми клетками.

Note. * $p < 0.05$ in comparison with the control; ** $p < 0.05$ in comparison with dead cells.

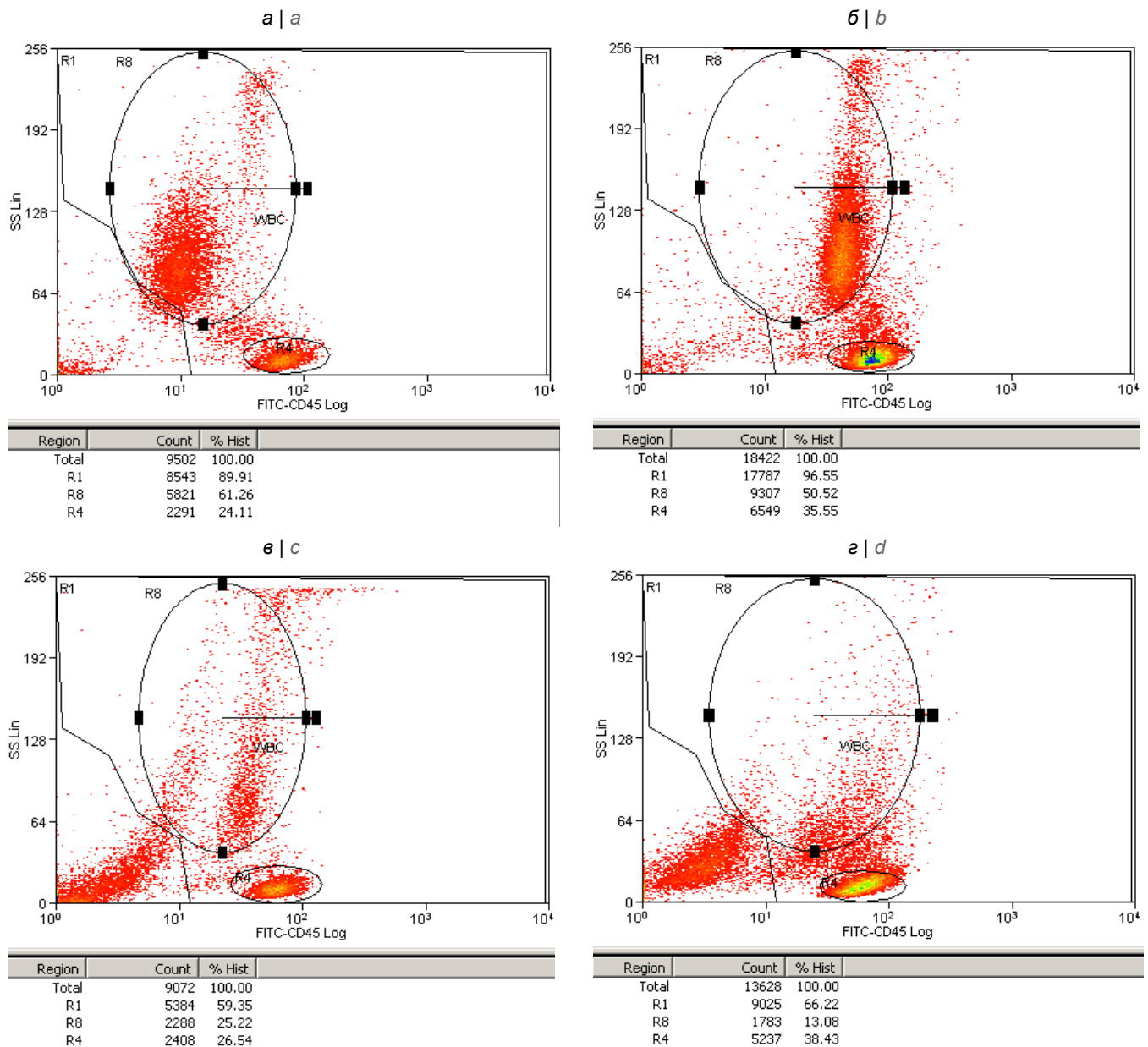


Рис. 1. Функциональная активация по экспрессии тирозиновой протеинфосфатазы (CD45), дегрануляция и лизис НГ в крови, обсеменённой живыми клетками *S. aureus*.

Цитограммы распределений лейкоцитов крови по степени гранулярности (боковому светорассеянию, SS) и уровню поверхностной экспрессии CD45 получены через 30 мин после добавления в кровь 0,9% NaCl — контроль (а), а также после добавления живых клеток *S. aureus* в дозе 10^8 м.к./мл — через 30 мин (б), 2 ч (в) и 4 ч (г).

В области R1 локализируются неповреждённые лимфоциты, моноциты и гранулоциты. В регионе R8 — гранулоциты, которые через 30 мин активированы по экспрессии CD45 (на цитограмме б), а затем переходят в состояния различной степени дегрануляции и аутолиза (на цитограммах в и г). За пределами области R1 на каждой цитограмме учитываются сигналы от клеточного дебриса — лизированных нейтрофилов. Доля неповреждённых нейтрофилов снижалась в крови (в регионе R8) к 4 ч до 13% с исходного значения 61,3% в контроле.

Fig. 1. Functional activation by expression of tyrosine protein phosphatase (CD45), degranulation and lysis of neutrophilic granulocytes in blood contaminated with live *S. aureus*

Cytograms of distributions of blood leukocytes according to the degree of granularity (side light scattering, SS) and the level of surface expression of CD45 were obtained 30 minutes after the addition of PBS-control (a) to the blood, and also after addition of live *S. aureus* cells at a dose of 10^8 mc/ml: 30 minutes (b), 2 hours (c) and 4 hours (d).

In the R1 region, intact lymphocytes, monocytes and granulocytes are localized. In the R8 region, granulocytes are activated after 30 min by CD45 expression (on cytogram b), and then go into states with varying degrees of their degranulation and autolysis (on cytograms c and d). Outside the R1 region, each cytogram takes into account signals from cellular debris — lysed neutrophils. The proportion of neutrophils decreased in the blood (in R8 region) by 4 hours to 13% from the initial value of 61.3% in the control.

Таблица 2. Результаты оценки изменений фенотипа нейтрофилов при моделировании стафилококковой бактериемии в зависимости от срока инкубации крови и жизнеспособности бактерий, Me (Q_{25} – Q_{75})

Table 2. The results of neutrophils phenotype changes estimation in the modeling of staphylococcal bacteremia, depending on the duration of blood incubation and the bacterial viability, Me (Q_{25} – Q_{75})

Показатель Parameter	Группа Group	Значения в различные сроки инкубации (мин) Values at different time points of incubation (min)				
		30	60	120	240	360
Экспрессия Expression						
CD45, MFI	Контроль Control	11,6 (10,2–13,4)	12,4 (10,6–5,0)	17,1 (14,5–18,8)	22 (20,2–24,4)	23,4 (20,6–25)
	Живые клетки Live cells	50,4 (46–55,5)**	56 (52,4–8,7)**	48,3 (46,2–1,8)**	66 (61,2–71,4)**	67 (63,4–70)**
	Убитые клетки Dead cells	27 (21,3–32,0)*	34 (30,3–37,4)*	36 (32,5–40,2)*	39 (37,8–41,6)*	38 (36,8–40,3)*
CD16, MFI	Контроль Control	286 (263–296)	292 (288–300)	304 (286–318)	324 (306–340)	335 (322–350)
	Живые клетки Live cells	330 (316–344)*	228 (201–67)**	148 (144–152)**	46 (41–50)**	37 (35–48)**
	Убитые клетки Dead cells	336 (323–342)*	299 (288–315)	296 (283–314)	310 (292–326)	300 (286–338)
Доля Share						
CD62L ⁺ , %	Контроль Control	41 (40,4–41,5)	41 (40,2–41,6)	45 (43,7–46,6)	34 (31,3–37,1)	32 (30,2–34,6)
	Живые клетки Live cells	32 (30,8–33,6)*	32 (31,1–33,4)*	33 (31,3–33,8)*	31 (30,2–32,4)	32 (31,3–31,9)
	Убитые клетки Dead cells	34 (33,4–34,5)*	27 (26,6–27,7)*	26 (24,2–27,3)*	27 (26,3–27,8)*	23 (21,5–26,6)*
CD63 ⁺ , %	Контроль Control	10 (8,8–11,6)	10 (9,2–13,8)	14 (11,4–16,3)	17 (15,5–19,7)	18 (16,3–21,4)
	Живые клетки Live cells	18 (17,2–19,0)**	35 (34,5–5,7)**	70 (67–72,4)**	83 (74,5–93)**	79 (68,4–90,2)**
	Убитые клетки Dead cells	12 (10,3–14,3)	13 (10,6–14,1)	15 (14,4–15,7)	19 (18,3–19,8)	19 (18,5–20,7)
CD95 ⁺ , %	Контроль Control	4 (2,7–8,4)	6 (5,5–6,6)	29 (24,2–33,7)	54 (48,4–60,4)	57 (51,2–63,3)
	Живые клетки Live cells	18 (17,4–19,5)**	46 (43,4–1,1)**	80 (78,2–82,8)**	65 (63,3–66,5)**	66 (62–70)**
	Убитые клетки Dead cells	6 (4,3–9,7)	10 (8,8–11,7)*	32 (28,2–35,5)	70 (68–72,2)*	80 (78,5–81,7)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** $p < 0,05$ по сравнению с убитыми клетками.
Note. * $p < 0.05$ in comparison with the control; ** $p < 0.05$ in comparison with dead cells.

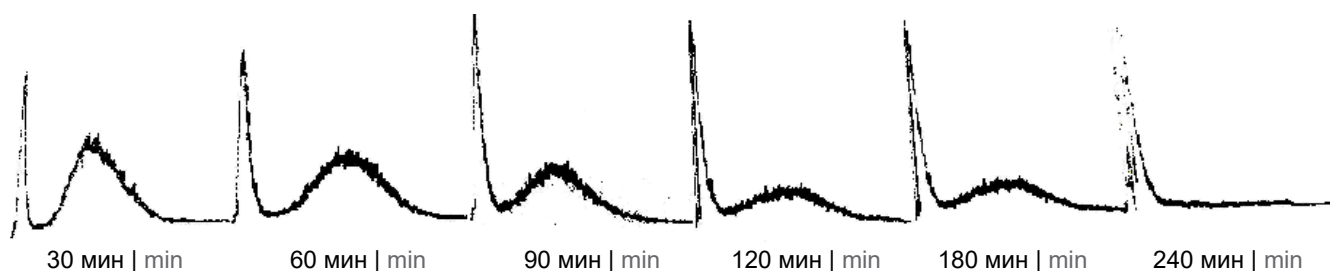


Рис. 2. Динамика нарушения стабильности мембран бактерицидных гранул в НГ, осуществляющих киллинг в крови *S. aureus*.

На каждой из 6 гистограмм представлено частотное распределение 30 000 лейкоцитов цельной крови человека по интенсивности красной флуоресценции цитоплазматических лизосомальных гранул в условных единицах (каналах цитометра от 10 до 256 по оси абсцисс) после суправитальной окраски акридиновым оранжевым. По оси ординат — количество клеток на канал от 0 до 1000. Два пика соответствуют лимфоцитам (слева) и гранулоцитам (справа). Краситель в большом количестве аккумулировался и удерживался гранулами фагоцитов в своей заряженной флуоресцирующей форме (АОН⁺) за счёт непрерывного перекачивания протонов H⁺ через неповреждённые мембраны лизосом живых клеток, что позволяло дифференцировать гранулоциты (около 60% лейкоцитов крови) по их интенсивной красной флуоресценции от лимфоцитов [21]. К 4 ч в гранулоцитах крови, взаимодействующих только с живым стафилококком, нарушалась стабильность мембран бактерицидных гранул, и клетки утрачивали свою интенсивную флуоресценцию в красной области спектра.

Fig. 2. Dynamics of bactericidal granules membrane stability disturbance in neutrophilic granulocytes that carry out the killing of *S. aureus* in the blood.

Each of 6 histograms shows the frequency distribution of 30,000 human whole blood leukocytes according to the intensity of red fluorescence of cytoplasmic lysosomal granules after supravital staining with acridine orange in arbitrary units (cytometer channels from 10 to 256 along the abscissa axis). The y-axis shows the number of cells per channel from 0 to 1000. Two peaks correspond to lymphocytes (left) and granulocytes (right). The dye was accumulated in large quantities and retained in phagocyte granules in its charged fluorescent form (AOH⁺) due to the continuous pumping of H⁺ protons through intact lysosome membranes of living cells, which made it possible to differentiate granulocytes (about 60% of blood leukocytes) by their intense red fluorescence from lymphocytes [21]. By 4 h, in blood granulocytes interacting only with live staphylococcus, the stability of bactericidal granule membranes was disturbed, and these cells lost their intense fluorescence in the red region of the spectrum.

Убитый стафилококк не индуцировал в течение 6 ч развития азурофильной дегрануляции в нейтрофилах цельной крови человека, в то время как в крови тех же доноров, обсеменённой живыми микробами, доля функционально активированных НГ с фенотипом CD63⁺ увеличивалась в 1,8 раза через 30 мин, в 3 раза через 1 ч (до 35%) и достигала максимума к 4 ч инкубации (табл. 2), когда в 80% гранулоцитов полностью нарушалась стабильность мембран бактерицидных гранул с активностью эластазы и миелопероксидазы (рис. 2 и рис. 1, з).

На фоне отсутствия реакции со стороны бактерицидных гранул нейтрофилов в крови, обсеменённой убитыми бактериями, плотность экспрессии CD16 на поверхности фагоцитов после 15% повышения через 30 мин фактически не менялась вплоть до 6 ч инкубации. При взаимодействии с живыми клетками *S. aureus* экспрессия Fc_γR 3b (CD16) на НГ существенно снижалась: на 30% через 1 ч, вдвое — через 2 ч, в 9 раз — к 6 ч инкубации. На поверхности около 80% нейтрофилов живой стафилококк индуцировал к 2 ч экспрессию фенотипического маркера раннего апоптоза, в то время как доля НГ с фенотипом CD95⁺ в контроле и пробах с убитыми бактериями была в этот срок около 30%. При дальнейшей инкубации крови, обсеменённой живыми микробами, доля НГ с фенотипом CD95⁺ снижалась (табл. 2).

В интервале времени от 4 до 6 ч, когда в подавляющем числе НГ полностью завершался процесс азурофильной дегрануляции, активировался лизис этих клеток в условиях моделирования *ex vivo* стафилококковой бактериемии, что проявлялось в максимальном снижении относительного количества гранулоцитов и повышении содержания клеточного дебриса в образцах крови с живыми бактериями (рис. 1, з). В присутствии убитых клеток *S. aureus* лизиса НГ в крови не регистрировали с помощью как микроскопии, так и проточной цитометрии (табл. 3).

По данным микроскопии, в крови с живыми бактериями присутствовали не только НГ с дегенеративными изменениями в ядрах и цитоплазме, но и морфологически изменённые эритроциты (рис. 3). Причём с момента активации процесса лейкоцитоллиза образцы крови с живыми бактериями изменяли свой алый красный цвет на цвет, характерный для гемолиза, но в контроле и в крови с убитыми микробами такие изменения отсутствовали. При морфологическом исследовании выявляли различную интенсивность дегенеративных изменений в НГ при двух самых высоких исходных микробных концентрациях, при которых живых бактерий в крови было больше, чем фагоцитов (50 м.к. и 5 м.к. на фагоцит). Однако адекватной количественной оценки степени различий в образцах при визуальном

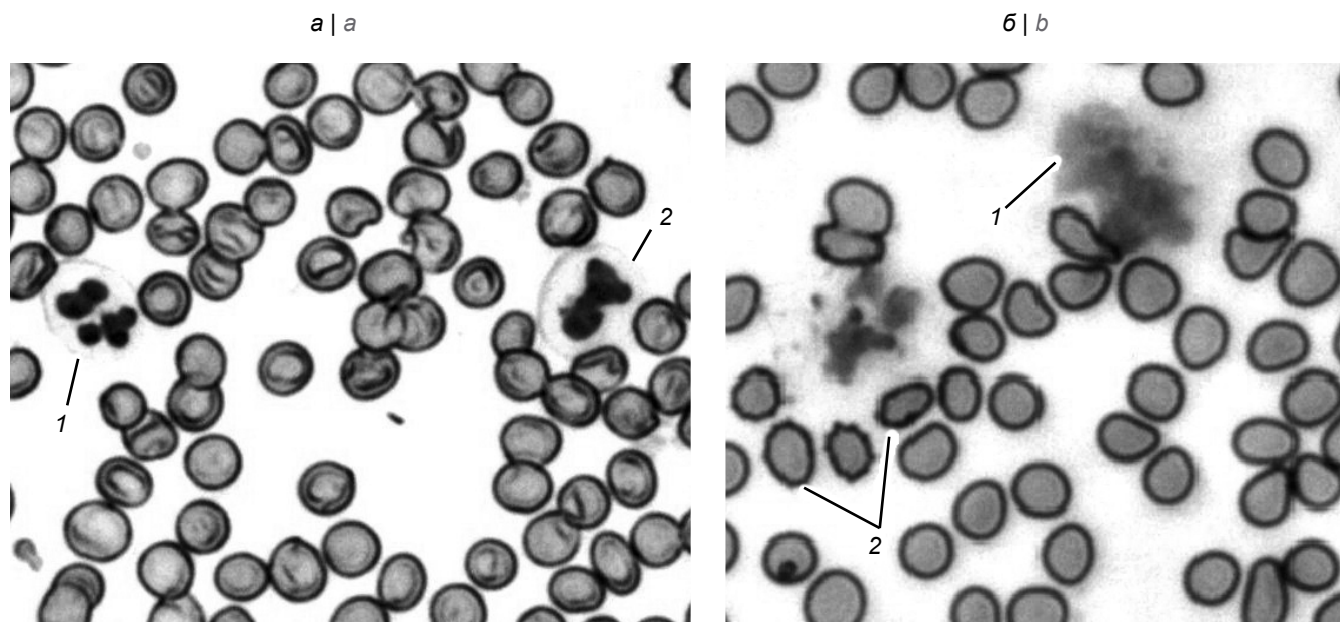


Рис. 3. Дегенеративные изменения в нейтрофилах и эритроцитах, индуцированные в крови человека живыми клетками *S. aureus*.

Мазки крови (× 400), окрашенные по Романовскому–Гимзе, через 6 ч инкубации с убитыми (а) и живыми (б) клетками *S. aureus*. а — сегментоядерный (1) и палочкоядерный (2) нейтрофилы с неповреждённой цитоплазматической мембраной и имеющие нормальную форму эритроциты (дискоциты);

б: 1 — нейтрофил на стадии нетоза; 2 — трансформированные эритроциты (эхиноцит и овалоцит).

Fig. 3. Degenerative changes in neutrophils and erythrocytes induced in human blood by live *S. aureus*.

Blood smears (× 400), stained according to Romanovsky–Giemsa, after 6 hours of incubation with killed (a) and live (b) *S. aureus*. а — segmented (1) and stab (2) neutrophils with an intact cytoplasmic membrane and normal shaped erythrocytes (discocytes);

б: 1 — neutrophil at the stage of netosis; 2 — transformed erythrocytes (echinocyte and ovalocyte).

Таблица 3. Интенсивность фенотипических и дегенеративных изменений в гранулоцитах крови человека при моделировании *ex vivo* стафилококковой бактериемии в зависимости от исходной микробной концентрации

Table 3. The intensity of phenotype end degenerative changes in human blood granulocytes depending on the initial microbial concentration in *ex vivo* modeling of staphylococcal bacteremia

Число, м.к./мл Number, mc/ml	Наличие (+) или отсутствие (-) роста Presence (+) or absence (-) of growth	Микроскопия Microscopy	Проточная цитометрия Flow cytometry			
		индекс дегенерации, % degeneration index, %	LDNs с фенотипом CD16 ^{low} , % LDNs with CD16 ^{low} phenotype, %	CD63 ⁺ -НГ, % CD63 ⁺ -NG, %	интенсивность лизиса НГ, % NG lysis intensity, %	клеточный дебрис, % cellular debris, %
10 ⁸	+	> 50	92,2 (88–96)*	78,8 (68–90)*	82 (77–85)*	33 (28–40)*
10 ⁷	+	< 50	36,4 (31–42)*	40,6 (35–44)*	37 (31–44)*	21 (15–25)*
10 ⁶	+	–	21,4 (19–23)*	28,2 (23–33)*	24 (18–31)*	12 (9–16)*
10 ⁵	+	–	9,1 (7,5–10,2)*	20,4 (17–25)	15 (11–21)	9,3 (6–10)
10 ⁴	+	–	6,3 (5,5–7,8)	18,3 (16–22)	16 (12–20)	7,7 (4–9)
10 ³	+	–	6,8 (4,4–8,6)	19,4 (18–21)	13 (9–19)	7,2 (5–10)
10 ²	–	–	5,9 (3,6–7,6)	17,7 (15–24)	15 (8–22)	6,0 (3–11)
10	–	–	5,6 (3,2–7,3)	18,6 (16–23)	12 (10–15)	5,6 (2–11)
Контроль Control	–	–	5,4 (3,3–6,7)	19 (18,5–20,7)	13 (8,3–16)	8,5 (5–12)

Примечание. CD16^{low} — снижение плотности экспрессии Fc_γR IIIb на НГ до уровня, который более чем вдвое ниже исходного уровня экспрессии в контроле; **p* < 0,05 по сравнению с контролем (показатели в крови через 6 ч инкубации без бактерий).

Note. CD16^{low} — a decrease in the expression density of Fc_γR IIIb on NG to a level that is more than two times lower than the initial level of expression in the control. **p* < 0.05 in comparison with control (indicators in the blood after 6 hours of incubation without bacteria).

исследовании мазков крови получено не было, т.к. невозможно было учесть число полностью разрушенных в условиях *ex vivo* клеточных элементов. Проточная цитометрия с точки зрения детекции дегенеративных изменений в НГ обладала более высокой чувствительностью и информативностью. Представленные в табл. 3 экспериментальные данные свидетельствуют, что при её использовании обеспечивается возможность количественной оценки интенсивности лейкоцитолита при моделировании *ex vivo* стафилококковой бактериемии и подсчёта числа LDNs с провоспалительными свойствами.

Выявлена сильная обратная корреляционная связь между интенсивностью азурофильной дегрануляции нейтрофилов, развивающейся в течение первых 2 ч при моделировании *ex vivo* стафилококковой бактериемии, и выживаемостью в крови человека клеток исследуемого штамма *S. aureus* ($r = -0,96$; $p = 0,00001$). В этот период времени число КОЕ снижалось в среднем на 70%, но затем, в интервале с 2 до 4 ч, рост *S. aureus* в крови активировался. После 4 ч число КОЕ в крови снова начинало снижаться и достигало через 6 ч уровня, соответствующего в среднем около 10% от исходного числа КОЕ (рис. 4). При концентрациях *S. aureus* выше 10² м.к./мл рост бактерий подавлялся в крови исследуемой группы лиц с 90% эффективностью, но полностью не прекращался. Основная масса микробов погибала в крови к 6 ч, не вызывая при нагрузках менее 1 м.к. на фагоцит

видимых дегенеративных изменений в НГ условно здоровых доноров. Проточная цитометрия на модели бактериемии *ex vivo* регистрировала рост относительного содержания LDNs в суммарной популяции гранулоцитов только при увеличении исходной концентрации живых бактерий в крови до 10⁵ м.к./мл и выше (табл. 3).

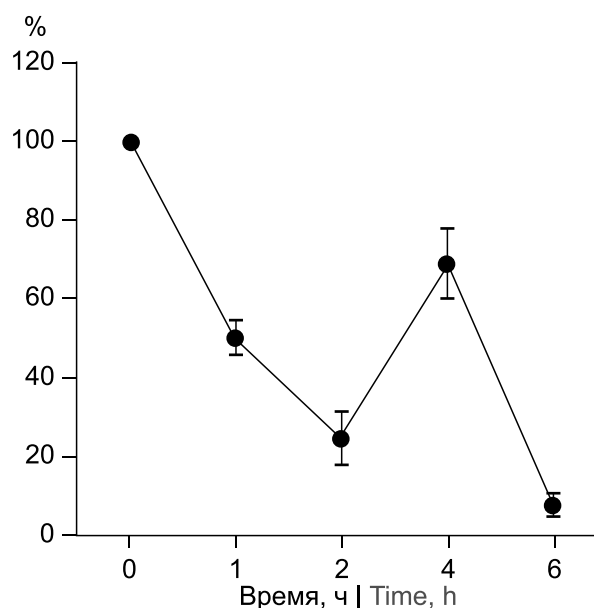


Рис. 4. Выживаемость *S. aureus* 209P в крови человека в зависимости от срока инкубации, Me (Q₂₅–Q₇₅).

Fig. 4. Survival of *S. aureus* 209P in human blood as a function of incubation time, Me (Q₂₅–Q₇₅).

Проявляя на модели бактериемии *ex vivo* свой выраженный активирующий и цитотоксический эффект по отношению к НГ периферической крови, живой стафилококк не оказывал повреждающего воздействия на лимфоциты в исследуемый период времени. Относительное содержание активированных лимфоцитов с фенотипом CD38⁺ через 6 ч не отличалось в крови, обсеменённой живыми микробами, от аналогичного показателя на этот срок в контроле. Однако оно было ниже, чем в образцах крови с убитыми клетками *S. aureus* — 19,6% (18,7–21,5%) и 23,3% (22,2–24,2%) соответственно ($p < 0,05$).

Обсуждение

В России ежегодно регистрируется 25–30 тыс. случаев инфекций кровотока, связанных с оказанием медицинской помощи, в которых этиологическим агентом выступает *Staphylococcus* spp. Причём условно-патогенный микроорганизм *S. aureus* является лидером среди приоритетных патогенов инфекций кровотока (15% из общего числа случаев в мире) [11]. Размножаясь в крови пожилых людей, новорождённых, а также лиц с различными иммунодепрессивными состояниями, *S. aureus* может индуцировать развитие тяжёлой формы бактериального сепсиса с гектической температурой и гнойными проявлениями [24].

Подходы к лечению бактериемии/сепсиса, вызванного *S. aureus*, имеют низкую доказательность и требуют оптимизации [25]. Недостаточно изучены факторы, влияющие на исход инфекционного процесса при стафилококковой бактериемии [26, 27]. Поскольку *S. aureus* в организме человека продуцирует ряд специфических факторов вирулентности, понимание, как этот микроорганизм манипулирует иммунной системой организма хозяина, требует детального изучения его взаимодействия с клетками врождённого иммунитета, причём на модели бактериемии *ex vivo*, а не только в опытах *in vitro* с предварительно выделенными из крови фагоцитами [18, 28].

Экспериментальные данные, полученные при выполнении настоящей работы, согласуются с выводами исследований Е.Е. Zwack и соавт. [18], в которых путём секвенирования РНК нейтрофилов были обнаружены на модели стафилококковой бактериемии *ex vivo* выраженные различия в способности живого и убитого нагреванием *S. aureus* влиять в крови человека на транскрипцию генов, связанных с врождённым иммунным ответом и передачей сигналов от цитокинов и хемокинов. Важно, что транскрипционная сигнатура нейтрофилов, характерная *ex vivo* для живых клеток *S. aureus*, полностью отсутствовала в крови с убитым *S. aureus*, а также при моделировании бактериемии живыми клетками штаммов *S. epidermis*, которые для человека являются значительно менее вирулентными. Наши иссле-

дования на модели стафилококковой бактериемии *ex vivo* впервые выявили выраженные различия в способности живых и убитых клеток *S. aureus* изменять экспрессию на поверхности НГ крови человека тирозиновой протеинфосфатазы (CD45), регулирующей FcR-опосредованную передачу сигналов при иммунном фагоцитозе, а также при антителозависимой цитотоксичности нейтрофилов, реализуемой этими клетками при нетозе (аутолизисе НГ) [29].

Только живые клетки *S. aureus* запускали *ex vivo*, по данным проведённого нами цитофлуориметрического анализа, секреторную азурофильную дегрануляцию НГ, необходимую для реализации бактерицидного эффекта по отношению к *S. aureus* и развития защитной воспалительной реакции на месте внедрения этого вида бактерий [30, 31], стимулировали снижение на НГ плотности экспрессии молекулярного триггера нетоза Fc γ RIIIb (CD16) [32], являющееся маркером IgG-зависимой анафилаксии [33], а также индуцировали в крови лизис НГ с интенсивностью, зависящей от исходной микробной концентрации и, как следствие, от микробной нагрузки на фагоцит в образцах цельной периферической крови. Всё это согласуется с выводами исследований В. McDonald и соавт., в которых *in vivo* на модели бактериемии/сепсиса у лабораторных животных было экспериментально доказано, что решающую роль в предотвращении диссеминации бактерий (*S. aureus* и *Escherichia coli*) и развития инфекционных осложнений играет процесс захвата и обезвреживания микробных клеток в сосудистом русле с помощью ДНК-сетей NETs [27]. Нейтрофилы в большом количестве аккумулировались при бактериемии/сепсисе в микрокапиллярах печени, где кровь с высокой эффективностью очищалась от живых бактерий нейтрофилами и макрофагами (клетками Купфера). В интервале времени 4–6 ч после внутривенного введения животным живых бактерий в периферической крови активировался аутолизис НГ (нетоз), что в 4 раза повышало эффективность их захвата и киллинга в сосудистом русле в сравнении с базовым уровнем, обеспечиваемым только макрофагальным фагоцитозом. Бактерии, полностью или частично обезвреженные в NETs, быстро поглощались и переваривались макрофагами.

Динамика киллинга клеток *S. aureus* в наших исследованиях *ex vivo* и установленная в работе корреляционная связь между выживаемостью бактерий в крови и интенсивностью процесса дегрануляции подтверждают, что для обезвреживания этого вида бактерий в крови человека нейтрофилы используют не только фагоцитоз, но и другие антибактериальные стратегии (секреторную дегрануляцию и нетоз). В течение первых 2 ч в крови погибали, видимо, только те бактерии, которые подвергались действию продуктов секреторной дегрануляции НГ и поглощались активными фагоцитами. Устойчивые

к фагоцитозу и внутриклеточному киллингу микробы (или микробные агломераты) обезвреживались после 4 ч инкубации, когда в фагоцитах завершалась азурофильная дегрануляция и активировался лизис НГ. Поскольку секреторная дегрануляция НГ и нетоз играют ключевую роль в повреждении тканей, обеспечивая цитотоксические функции [4], задержка этих процессов в условиях *in vivo*, связанная с нарушением фагоцитарной функции НГ при различных иммунодепрессивных состояниях, может приводить к генерализации воспалительного процесса с развитием характерных для сепсиса инфекционных осложнений [8, 15].

По результатам оценки стимуляции в гранулоцитах крови кислородного метаболизма эти клетки в отношении живых бактерий проявляли *ex vivo* более низкую фагоцитарную активность, чем по отношению к убитому стафилококку. Это можно объяснить агглютинацией коагулазоположительных штаммов *S. aureus* в образцах цельной периферической крови. Препятствуя фагоцитозу, агглютинация способствует развитию у пациентов с бактериемией тяжёлых инфекционных осложнений, характерных для стафилококкового сепсиса [26]. По данным L. Thomeg и соавт., через 60 мин после добавления в кровь живых клеток *S. aureus* агглютинации подвергалось около 36% бактерий, и только около 64% из них поглощалось фагоцитами [34]. Для обезвреживания в крови устойчивых к фагоцитозу агломератов клеток *S. aureus* требовалось «включение» через FcR на клеточной поверхности не связанного с фагоцитозом механизма внеклеточной бактерицидности НГ присутствующими в плазме специфическими антителами к вызывающим агглютинацию продуктам секреции *S. aureus*.

«Выбирать» механизм бактерицидности для киллинга патогенных микроорганизмов (фагоцитоз или нетоз) позволяет наличие на поверхности НГ сенсоров, дифференцирующих по размеру отдельные мелкие бактерии от их крупных агломератов, образующихся в плазме в процессе агглютинации [35]. Живой *S. aureus* считается самым эффективным индуктором нетоза при взаимодействии с НГ крови человека, но убитые нагреванием клетки *S. aureus* такой способностью, как известно, не обладают. Ключевую роль в формировании NETs играет белок А, продуцируемый *S. aureus* во внеклеточное пространство, который препятствует фагоцитозу, связываясь с FcR клеток врождённого иммунитета [36]. Поскольку используемый нами штамм *S. aureus* имеет ген, кодирующий продукцию белка А [37], выраженные изменения в экспрессии CD16 на клеточной поверхности, зарегистрированные в наших исследованиях на модели бактериемии *ex vivo*, могут быть связаны с действием этого белка на Fc_γR1bB клеток первой линии врождённой антибактериальной защиты.

Исследования, проведённые на НГ, предварительно выделенных из периферической крови с помощью градиентного центрифугирования, свидетельствуют, что при фагоцитозе *S. aureus* в этих клетках запускается механизм индуцируемой бактериями апоптотической гибели, и апоптотические клетки, поглотившие живые микробы, подвергаются к 6 ч инкубации в системе *in vitro* неизбежному аутолизису (вторичному постапоптотическому некрозу — некроптозу) [19] вследствие отсутствия *in vitro* макрофагов, необходимых для реализации функции эффероцитоза [8]. По данным, полученным нами на модели стафилококковой бактериемии *ex vivo*, в крови с живыми клетками *S. aureus* появлялись НГ с фенотипом CD95⁺, которые впоследствии подвергались аутолизису. Интенсивный лизис НГ в крови с живыми бактериями, вероятно, был связан как с нетозом, так и с вторичным некрозом активных фагоцитов.

Высокую степень тяжести заболевания и серьёзный прогноз при сепсисе клиницисты предполагают в случаях, когда индексы дегенерации нейтрофилов в крови пациентов более 50% [24]. Наши экспериментальные данные подтверждают вывод R. Sun и соавт. о том, что субъективный микроскопический метод не пригоден для раннего обнаружения и адекватного изучения LDNs в образцах цельной периферической крови человека [12]. В случаях, когда нейтрофилы выделяются из крови методом градиентного центрифугирования, популяция LDNs фактически теряется и, как следствие, не учитывается, поскольку клетки этой популяции аккумулируются в основном во фракции более низкой плотности вместе с лимфоцитами и моноцитами [13, 14]. Использование проточной цитометрии может повысить эффективность изучения популяции LDNs в крови не только на модели стафилококковой бактериемии *ex vivo*, но и бактериемии, моделируемой с использованием грамотрицательных бактерий. Для нас особый интерес представляют возбудители особо опасных бактериальных инфекций, которые, являясь факультативными внутриклеточными паразитами, могут длительно размножаться в периферической крови (микрокапиллярах печени и других органов), не вызывая развития в организме защитной воспалительной реакции [8]. В исследованиях с такими бактериями данные, полученные в опытах с клетками *S. aureus*, могут быть использованы в качестве положительного контроля высокой эффективности антибактериального реагирования нейтрофилов периферической крови человека.

Заключение

Таким образом, благодаря использованию проточной цитометрии и процедуры иммунофенотипирования лейкоцитов крови по протоколу

Lyse/No-Wash, в работе получены экспериментальные данные, дополняющие современную информацию о различном воздействии живого и убитого *S. aureus* на функциональную активность НГ крови человека. В образцах крови условно здоровых доноров выявлены различия в реакции по фенотипическим маркерам CD45, CD63, CD62L, CD16, CD95 и способности стимулировать *ex vivo* лизис этих клеток. Полученные результаты могут быть перспективной основой для дальнейшего уточнения особенностей реакции НГ в условиях *ex vivo* с целью выявления лиц с высоким риском развития стафилококкового сепсиса.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Бицадзе В.О., Хизроева Д.Х., Макацария А.Д. и др. COVID-19, септический шок и синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. Часть 1. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2020;75(2):118–28. Bitsadze V.O., Khizroeva D.Kh., Makatsariya A.D., et al. COVID-19, septic shock and syndrome of disseminated intravascular coagulation syndrome. Part 1. *Annals of the Russian Academy of Medical Science*. 2020;75(2):118–28. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn1335> EDN: <https://elibrary.ru/azzjtr>
2. Гоманова Л.И., Фокина М.А. Актуальные вопросы клинической картины и диагностики септического шока. *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(2):239–52. Gomanova L.I., Fokina M.A. Topical issues of clinical symptoms and diagnostics of septic shock. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(2):239–52. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-TIO-1811> EDN: <https://elibrary.ru/vfmepd>
3. Shen X., Cao K., Zhao Y., Du J. Targeting neutrophils in sepsis: from mechanism to translation. *Front. Pharmacol.* 2021;12:644270. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.644270>
4. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Матосова Е.В. Защитные стратегии нейтрофильных гранулоцитов от патогенных бактерий. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2017;(1):4–18. Andryukov B.G., Somova L.M., Drobot E.I., Matosova E.V. Defensive strategy of neutrophilic granulocytes against pathogenic bacteria. *Health, Medical Ecology, Science*. 2017;(1):4–18. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.345606> EDN: <https://elibrary.ru/ygtuuz>
5. Tang A.H., Brunn G.J., Cascualho M., Platt J.L. Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis and related conditions. *J. Leukoc. Biol.* 2007;82(2):282–5. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.1206752>
6. Aasen A.O., Ohlson R. Release of granulocyte elastase in lethal canine endotoxin shock. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 1978;359(6):683–90. DOI: <https://doi.org/10.1515/bchm.1978.359.1.683>
7. Guéant J.L., Guéant-Rodrigues R.M., Fromonot J., et al. Elastase and exacerbation of neutrophil innate immunity are involved in multi-visceral manifestations of COVID-19. *Allergy*. 2021;76(6):1846–58. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.14746>
8. Silva M.T. Bacteria-induced phagocyte secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 2010;88(5):885–96. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0410205>
9. Madoiwa S., Tanaka H., Nagahama Y., et al. Degradation of cross-linked fibrin by leukocyte elastase as alternative pathway for plasmin-mediated fibrinolysis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.* 2011;127(4):349–55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.12.008>
10. Грувер К.П., Белобородов В.Б. Клиническое значение bacteremii у больных сепсисом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2011;13(1):90–7. Gruver K.P., Beloborodov V.B. Clinical significance of bacteremia in patients with sepsis. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;13(1):90–7. EDN: <https://elibrary.ru/ndnrsz>
11. Каргальцева Н.М., Миронов А.Ю., Суранова Т.Г. и др. Эпидемиологическая характеристика инфекции кровотока у пациентов с соматическими заболеваниями. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2021;26(5):238–47. Kargal'tseva N.M., Mironov A.Yu., Suranova T.G., et al. Epidemiological characteristics of bloodstream infection in patients with somatic diseases. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2021;26(5):238–47. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID108458> EDN: <https://elibrary.ru/kzaedg>
12. Sun R., Huang J., Yang Y., et al. Dysfunction of low-density neutrophils in peripheral circulation in patients with sepsis. *Sci. Rep.* 2022;12(1):685. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04682-x>
13. Cloke T., Munder M., Tayler J., et al. Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection. *PLoS One*. 2012;7(11):e48939. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048939>
14. Morrissay S., Geller A.E., Hu X., et al. A specific low-density neutrophil population correlates with hypercoagulation and disease severity in hospitalized COVID-19 patients. *JCI Insight*. 2021;6(9):e148435. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.148435>
15. Camisia G., Pozner R., de Larrañaga G. Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock*. 2014;42(4):286–94. DOI: <https://doi.org/10.1097/shk.0000000000000221>
16. Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.Н. и др. Оценка интенсивности дегрануляции и изменений фенотипа нейтрофилов по уровню экспрессии Fc γ RIIIb в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):172–84. Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., et al. Assessment of neutrophil degranulation intensity and changes in neutrophil phenotype by Fc γ RIIIb expression level in blood of patients with COVID-19 and convalescents. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(2):172–84. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-225> EDN: <https://elibrary.ru/gkyogg>
17. Bassøe C.F., Solberg C.O. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human leukocytes: quantitation by a flow cytometric and a microbiological method. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. C*. 1984;92(1):43–50. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1984.tb00050.x>
18. Zwack E.E., Chen Z., Delvin J.C., Torres V. *Staphylococcus aureus* induces a muted host response in human blood that blunts the recruitment of neutrophils. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2022;119(31):e2123017119
19. Kobayashi S.D., Braughton R.R., Palazzolo-Ballance A.M., et al. Rapid neutrophil destruction following phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *J. Innate Immun.* 2010;2(6):560–75. DOI: <https://doi.org/10.1159/000317134>
20. Долгушин И.И., Маркова В.А., Квятковская С.В. и др. Анализ функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови методом проточной цитофлюориметрии у здоровых доноров. *Российский иммунологический журнал*. 2014;8(3):305–7. Dolgushin I.I., Markova V.A., Kvyatkovskaya S.V., et al. Analysis the functional activity of peripheral blood neutrophils by flow cytometry in healthy donors. *Russian Journal of Immunology*. 2014;8(3):305–7. EDN: <https://elibrary.ru/tffrlh>

21. Traganos F., Darzynkiewicz Z. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. *Methods Cell Biol.* 1994;41:185–94. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61717-3](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61717-3)
22. Abrams W.R., Diamond L.W., Kane A.B. A flow cytometric assay of neutrophil degranulation. *J. Histochem. Cytochem.* 1983;31(6):737–44. DOI: <https://doi.org/10.1177/31.6.6404983>
23. Kravtsov A.L., Grebenyukova T.P., Kuznetsov O.S., et al. Flow microfluorometric analysis of phagocyte degranulation in bacteria infected whole blood cell cultures. In: *Proceedings SPIE – The International Society for Optical Engineering. Volume 4707.* Saratov;2002:395–402. DOI: <https://doi.org/10.1117/12.475607>
EDN: <https://elibrary.ru/mradhp>
24. Козинец Г.И., Высоцкий В.В. Погорелов В.М. и др. *Кровь и инфекция.* М.;2001. Kozinets G.I., Vysotskii V.V. Pogorelov V.M., et al. *Blood and Infection.* Moscow;2001.
25. Белобородов В.Б. Новые возможности лечения бактериемии и сепсиса, вызванных стафилококками. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2014;19(5):19–25. Beloborodov V.B. New therapeutic approach for the treatment for staphylococcal bacteremia and sepsis. *Epidemiology and Infectious Diseases.* 2014;19(5):19–25. EDN: <https://elibrary.ru/syelph>
26. McAdow M., Kim H.K., Dedent A.C., et al. Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. *PLoS Pathog.* 2011;7(10):e1002307. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002307>
27. McDonald B., Urrutia R., Yipp B.G., et al. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe.* 2012;12(3):324–33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.011>
28. Guo H., Hall J.W., Yang J., Ji Y. The SaeRS two-component system controls survival of *Staphylococcus aureus* in human blood through regulation of coagulase. *Front Cell. Infect. Microbiol.* 2017;7:204. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00204>
29. Guo H., Henderson A., Kenneth C., Solveig S., Gericson S. Effects of the protein tyrosine phosphatase CD45 on Fc γ RIIa signaling and neutrophil function. *Exp. Hematology.* 2000;28(9):1062–70. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(00\)00513-0](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(00)00513-0)
30. Reeves E.P., Lu H., Jacobs H.L., et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature.* 2002;416(6878):291–7. DOI: <https://doi.org/10.1038/416291a>
31. Shi J., Ganz T. The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids. *Infect. Immun.* 1998;66(8):3611–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.66.8.3611-3617.1998>
32. Rosales C., Uribe-Querol E. Neutrophil activation by antibody receptors. In: Khajah M., et al. *Neutrophils.* London;2019. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.80666>
33. Khodoun M.V., Strait R., Armstrong L., et al. Identification of markers that distinguish IgE-from IgG-mediated anaphylaxis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011;108(30):12413–8. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1105695108>
34. Thomer L., Emolo C., Thammavongsa V., et al. Antibodies against a secreted product of *Staphylococcus aureus* trigger phagocytic killing. *J. Exp. Med.* 2016;213(3):293–301. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20150074>
35. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S., et al. Neutrophils sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* 2014;15(11):1017–25. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.2987>
36. Hoppenbrouwers T., Sultan A.R., Abraham T.E., et al. Staphylococcal protein A is a key factor in neutrophil extracellular traps formation. *Front. Immunology.* 2018;9:165. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00165>
37. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Фомина Л.О. и др. Оценка цитокиноподобной активности *Staphylococcus aureus* в зависимости от наличия генетических детерминант стафилококкового белка А. *Российский иммунологический журнал.* 2019;13(3):1163–7. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Fomina L.O., et al. Estimation of cytokin-like activity of *Staphylococcus aureus* depending on the availability of genetic determinant of staphylococcal protein A. *Russian Journal of Immunology.* 2019;13(3):1163–7. DOI: <https://doi.org/10.31857/S102872210007247-6>
EDN: <https://elibrary.ru/ljuktg>

Информация об авторах

Кравцов Александр Леонидович[✉] — д.б.н., в.н.с. отдела иммунологии Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, kravzov195723@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Бугоркова Светлана Александровна — д.м.н., и.о. зав. отделом иммунологии Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Клюева Светлана Николаевна — к.б.н., н.с. отдела иммунологии Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>

Шмелькова Татьяна Петровна — к.б.н., с.н.с. отдела образовательных программ и подготовки специалистов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5891-6028>

Кожевников Виталий Александрович — м.н.с. отдела иммунологии Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7267-7027>

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

Information about authors

Aleksandr L. Kravtsov[✉] — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, kravzov195723@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Svetlana A. Bugorkova — D. Sci. (Med.), Head, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Svetlana N. Klyueva — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>

Tatyana P. Shmelkova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of educational programs and specialist training, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-001-5891-6028>

Vitaly A. Kozhevnikov — junior researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7267-7027>

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 30.06.2023;
accepted for publication 08.08.2023;
published 28.08.2023

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-402>



Молекулярно-генетическая характеристика и филогенетический анализ возбудителей норовирусной инфекции человека отдельных муниципалитетов в Свердловской области за 2022 год

Быков Р.О.^{1✉}, Скрыбина С.В.², Килячина А.С.³, Итани Т.М.¹, Чалапа В.И.¹,
Старикова П.К.¹, Колтунов С.В.³, Пономарева А.В.², Семенов А.В.^{1,4}

¹Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Екатеринбург, Россия;

²Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Свердловской области, Екатеринбург, Россия;

³Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Свердловской области, Екатеринбург, Россия;

⁴Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Норовирусы являются высококонтагиозными возбудителями острой норовирусной инфекции (НВИ) человека. Известно, что преобладающей генетической группой в структуре заболеваемости норовирусным гастроэнтеритом по всему миру является GII. Ранее на территории Свердловской области в отдельных муниципалитетах молекулярно-генетический мониторинг вместе с филогенетическим анализом не проводился, поэтому не предоставляется возможным объективно оценить генетическое разнообразие популяции норовирусов.

Цель работы — выполнить генотипирование и провести филогенетический анализ возбудителей НВИ человека на территории Екатеринбурга, Нижнего Тагила, Каменск-Уральского за 2022 г.

Материалы и методы. Был организован сбор образцов фекального материала от больных детей с НВИ на территории Свердловской области. Все образцы были анализированы методом ПЦР с вырожденными праймерами, фланкирующими регион ORF1/ORF2. Нуклеотидные последовательности участка генома возбудителей НВИ определяли методом секвенирования по Сэнгеру. Был проведен филогенетический анализ консенсусных последовательностей с построением аддитивных филограмм.

Результаты. Общее количество исследованных образцов составило 220. По результатам секвенирования удалось типировать 73 возбудителя НВИ. Наибольший удельный вес в генотипической структуре занимают норовирусы, относящиеся к геногруппе GII (58%), и норовирусы, относящиеся к геногруппе GI (42%). Норовирусы, относящиеся к генотипам GII.17, GI.3, являются доминирующими вирусами, выявленными на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области. Филогенетический анализ демонстрирует, что идентифицированные последовательности на территории Свердловской области обладают наименьшей генетической дистанцией, что даёт основание для их объединения в общий кластер.

Заключение. Впервые на территории Свердловской области был проведен генетический анализ возбудителей. Система генотипирования норовирусов, основанная на амплификации региона ORF1/ORF2, позволяет успешно идентифицировать различные генотипы норовирусов. Было подтверждено, что норовирусы GII остаются доминирующей генетической группой. Результаты филогенетического анализа демонстрируют наибольшую гомологию в сформированных кластерах между изолятами из Екатеринбурга, Нижнего Тагила, Каменск-Уральского.

Ключевые слова: норовирусы, генотипирование, филогенетический анализ, геногруппа GII

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФНИИВИ «Виром» (протокол № 1 от 17.03.2023).

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках государственного задания ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора (рег. № НИР 123051100045-0).

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

Для цитирования: Быков Р.О., Скрыбина С.В., Килячина А.С., Итани Т.М., Чалапа В.И., Старикова П.К., Колтунов С.В., Пономарева А.В., Семенов А.В. Молекулярно-генетическая характеристика и филогенетический анализ возбудителей норовирусной инфекции человека отдельных муниципалитетов в Свердловской области за 2022 год. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):306–313.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-402>

EDN: <https://www.elibrary.ru/qiehre>

Genetic characterization and phylogenetic analysis of human norovirus infection in individual municipalities of the Sverdlovsk region in 2022

Roman O. Bykov^{1✉}, Svetlana V. Scriabina², Anastasia S. Kilyachina³, Tarek M. Itani¹, Vladislav I. Chalapa¹, Polina K. Starikova¹, Stanislav V. Koltunov³, Angelika V. Ponomareva², Aleksandr V. Semenov^{1,4}

¹Federal Scientific Research Institute of Viral Infections «Virome», Ekaterinburg, Russia;

²Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Sverdlovsk Region, Ekaterinburg, Russia;

³Center for Hygiene and Epidemiology in the Sverdlovsk Region, Ekaterinburg, Russia;

⁴Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Human Noroviruses (HuNoV) are highly contagious pathogens responsible of acute human norovirus infection (HuNoVI). GII.4 is the prevailing norovirus genotype in the incidence of gastroenteritis worldwide. Currently there are no studies on the molecular monitoring and phylogenetic analysis of HuNoV in the territory of the Sverdlovsk region, therefore it is not possible to objectively assess their genetic diversity.

The **aim** of the study is to carry out genotyping and phylogenetic analysis of HNoVI in municipalities of the Sverdlovsk region: Ekaterinburg, Nizhny Tagil, Kamensk-Uralsky in 2022.

Materials and methods. Fecal samples were collected from children suffering from HuNoVI in the municipalities of the Sverdlovsk region. Viral RNA was extracted from stool samples followed by reverse transcription polymerase chain reaction with degenerate primers flanking the ORF1/ORF2 junction. The amplified samples were genotyped by Sanger sequencing. Multiple sequence alignments were carried out and phylogenetic trees were constructed.

Results. The total number of studied samples was 220. According to sequencing results, 73 positive sequences of HuNoV were typed, which represents 33% of the total volume of the studied samples. The largest share of genotypes is occupied by noroviruses GII (58%), noroviruses GI (42%). Noroviruses GII.17, GI.3 were the dominant genotypes. Phylogenetic analysis demonstrates that the identified sequences on the territory of the Sverdlovsk region have the smallest genetic distance, which gives grounds for their unification into a common cluster.

Conclusion. For the first time, a genetic analysis of HuNoV was carried out in the territory of the Sverdlovsk region. The norovirus genotyping system based on the amplification of the ORF1/ORF2 region makes it possible to successfully identify various genotypes of noroviruses from the Sverdlovsk region. It has been confirmed that GII noroviruses remain the dominant genetic group. The results of phylogenetic analysis demonstrate the greatest homology in the formed clusters between isolates from Ekaterinburg, Nizhny Tagil, Kamensk-Uralsky.

Keywords: *noroviruses, genotyping, phylogenetic analysis, genogroup GII*

Ethics approval. The study was conducted with the voluntary informed consent of the legal representatives of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Federal Scientific Research Institute of Viral Infections «Virom» (protocol No. 1, March 17, 2023).

Funding source. The study was carried out within the framework of the state task of the FNIIVI "Virom" of Rospotrebnadzor (registration No. NIR 123051100045-0).

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

For citation: Bykov R.O., Scriabina S.V., Kilyachina A.S., Itani T.M., Chalapa V.I., Starikova P.K., Koltunov S.V., Ponomareva A.V., Semenov A.V. Genetic characterization and phylogenetic analysis of human norovirus infection in individual municipalities of the Sverdlovsk region in 2022. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(4):306–313. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-402>. EDN: <https://www.elibrary.ru/qjehre>

Введение

В глобальном масштабе норовирусы являются причиной каждого пятого случая острого небактериального гастроэнтерита и ежегодно вызывают порядка 699 млн случаев заболевания и более

200 тыс. случаев смерти [1, 2]. Норовирусы реализуют своё заразное начало с помощью фекально-орального механизма передачи. Для инфицирования реактивного организма человека требуется около 18 вирусных частиц [2]. Норовирусная инфекция

(НВИ) — убиквитарная, в эпидемический процесс вовлекаются все возрастные группы населения, большая часть заболеваемости и смертности приходится на детей и людей пожилого возраста [3, 4].

Норовирусы — безоболочечные РНК-содержащие вирусы, относящиеся к роду *Norwalk*, семейству *Caliciviridae*. Норовирус входит в генетически разнообразную группу вирусов, поражающих широкий спектр видов млекопитающих-хозяев. Геном норовируса представлен тремя открытыми рамками считывания (ORF), которые контролируют синтез вирусных белков (ORF1 — РНК-зависимая РНК-полимераза, ORF2 — мажорный капсидный белок VP1, ORF3 — минорный капсидный белок VP2) [5, 6]. Белок VP1 отвечает за связывание вирусов с клеточными рецепторами — полисахаридными антигенами групп крови человека. Белок VP2 стабилизирует вирусную частицу и участвует в сборке вирионов [7]. В последние годы было зарегистрировано несколько новых генотипов норовирусов, что потребовало обновления существующей схемы классификации [8].

Классификация генотипов норовируса основана на определении типовой принадлежности двух участков РНК-генома: участка, кодирующего основной капсидный белок, — VP1-типирование; участка, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу, — Р-типирование. В результате типирования дифференцируют Р-группы и Р-типы. Современная классификация, основанная на типировании участка VP1, включает 10 сформированных генотипов и до 49 генотипов [8]. Формированию новых генотипов внутри генотипов способствуют гомологичные, межгенные, субгенные рекомбинации. Выделяют несколько основных «горячих точек мутационных замен» в геноме, где чаще всего образуются рекомбинанты: регион ORF1/ORF2 и ORF2, кодирующие структурные и неструктурные белки; область ORF2 — главный капсидный белок VP1 (гипервариабельные домены и субдомены главного капсидного белка S, P1, P2) [9–12].

Вторая генетическая группа GII вызывает более 50% случаев вспышечной заболеваемости по всему миру. Превалирующим генотипом в генотипической структуре НВИ человека является GII.4 [13, 14]. На фоне ограничительных мероприятий в отношении коронавирусной инфекции в 2020 г. произошло снижение заболеваемости НВИ в 2 раза. Однако в 2021 г. показатель заболеваемости НВИ в России увеличился на 40%¹. Наибольший удельный

вес в генотипической структуре возбудителей НВИ на территории России занимает GII.4.

Из-за высокой частоты рекомбинационной изменчивости каждые 2–3 года новые варианты GII.4 последовательно заменяют друг друга, быстро распространяясь среди населения всего мира [3]. На территории Свердловской области ранее не проводился молекулярно-генетический мониторинг циркуляции возбудителей НВИ вместе с филогенетическим анализом. Использование унифицированной системы генотипирования норовирусов и последующий филогенетический анализ позволят в полной мере оценить генетическое разнообразие норовирусов, а также отслеживать события эволюционной дивергенции внутри вирусной популяции.

Цель исследования — генотипирование и филогенетический анализ возбудителей НВИ человека на территории Екатеринбурга, Нижнего Тагила, Каменск-Уральского за 2022 г.

Материалы и методы

С февраля 2022 г. по декабрь 2022 г. проводился сбор образцов фекального материала от больных детей с НВИ на территории Свердловской области в муниципалитетах с повышенной заболеваемостью: Екатеринбург, Нижний Тагил, Каменск-Уральский. НВИ в биологических образцах была лабораторно подтверждена методами иммуноферментного анализа (ИФА) и/или полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Общее количество исследованных образцов составляет 220.

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора (протокол № 1 от 17.03.2023).

Выделение РНК, ПЦР и секвенирование

Из нативных образцов фекалий готовилась 10% суспензия в физиологическом растворе, из которой выделялись нуклеиновые кислоты методом переосаждения с использованием набора реагентов «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии). Затем производилась обратная транскрипция для получения кДНК на матрице РНК при помощи комплекта реагентов «РЕВЕРТА-L» (ЦНИИ Эпидемиологии). Для амплификации возбудителя НВИ был выбран специфический участок генома, соответствующий региону ORF1/ORF2 (участки генома, контролирующие экспрессию РНК-зависимой РНК-полимеразы и главного капсидного белка VP1). Для постановки ПЦР был использован протокол с вырожденными праймерами, фланкирующими регион ORF1/ORF2 [6]. Для приготовления реакционной смеси использовали «5x ScreenMix» («Евроген») и последовательности вырожденных праймеров для амплификации участка генома первой и второй гено-

¹ Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году». URL: <https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/594/sqywwl4tg5arqff6xvl5dss017vuuank/Gosudarstvennyy-doklad.-O-sostoyanii-sanitarno-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-Rossiyskoy-Federatsii-v-2021-godu.pdf>

групп норовируса: G1SKF, G1SKR, G2SKF, G2SKR. Температурный профиль протокола амплификации проходил при 94°C в течение 3 мин, 40 циклов при 94°C, 50°C и 72°C в течение 2 мин, 72°C в течение 7 мин. Экстракция кДНК из геля проводилась при помощи набора реагентов «PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit» («Invitrogen», «Lifetechnologies»). Последующее определение нуклеотидных последовательностей генома норовирусов производили методом секвенирования по Сэнгеру при помощи набора реагентов «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems»).

Филогенетический анализ

Идентификацию полученной генетической последовательности проводили при помощи сервиса BLAST. Для создания консенсусной последовательности выбирали референсные последовательности норовируса, представленные в GenBank, демонстрирующие наибольшую гомологию с типированным образцом. Анализ и применение алгоритма множественного выравнивания (ClustalW) типированных генетических последовательностей норовируса человека проводили в программе «MEGA v. 11». Для создания филогенетических деревьев и определения попарных расстояний между таксонами в двух геногруппах норовирусов использовали метод ближайших соседей вместе с параметрической моделью Kimura-2. Достоверность топологии аддитивных филограм оценивали методом повторных выборок на основании анализа 1000 псевдорепликаций. На филограммах указываются статистические индексы поддержки более 60. Генетическое разнообразие полученных кластеров анализировали в программе «MEGA v. 11». Консенсусные последовательности были депонированы в GenBank: ON681575.1–ON681586.1, OP862432.1, OP862428.1–OP862431.1, OP862363.1–OP862368.1.

Результаты

Распределение и распространение генотипов норовируса

Всего за анализируемый период было исследовано 220 образцов клинического материала. По результатам секвенирования удалось типировать 73 возбудителя НВИ, что составляет 33% общего объема исследованных образцов. В результате генотипирования по Сэнгеру установлено, что наибольший удельный вес в генотипическом профиле норовирусов приходится на вторую геногруппу GII ($n = 42$ (58%)), норовирусы GI ($n = 31$ (42%)). Выявлены различные генотипы возбудителей НВИ на территории отдельных муниципалитетов (рис. 1). Генотипическое распределение полученных последовательностей имеет следующий вид: GII.17 ($n = 28$; 40%); GI.3 ($n = 23$; 33%); GII.4 ($n = 7$; 10%); GI.6 ($n = 5$; 7%); GII.3 ($n = 4$; 6%); GI.7 ($n = 3$; 4%). Норовирусы, относящиеся к генотипам GII.17, GI.3, являются доминирующими вирусами, выявленными на территории отдельных муниципалитетов в Свердловской области за 2022 г. (рис. 2).

Филогенетический анализ норовирусов GI и GII

Последовательности GI.5 из Екатеринбурга группируются в общий кластер. Изоляты из данного кластера генетически неоднородны. Последовательность GI.5_197 имеет меньшую гомологию и наибольшую генетическую дистанцию между другими генотипами, входящими в кластер. Последовательности GI.5 из Екатеринбурга образуют парафилетическую группу с близкородственными генотипами из Таиланда и Южной Африки.

Последовательности GI.6 из Екатеринбурга входят в общий кластер. Последовательности из данного кластера образуют парафилетическую группу с близкородственными генотипами из Японии.

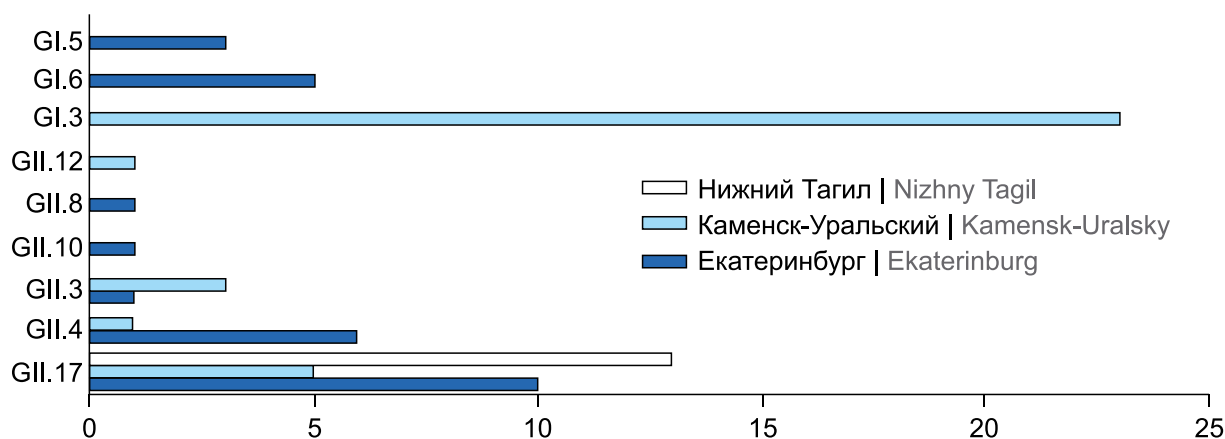


Рис. 1. Распределение выявленных генотипов в отдельных муниципалитетах Свердловской области за 2022 г.

Fig. 1. Distribution of identified genotypes in selected municipalities of the Sverdlovsk region for 2022.

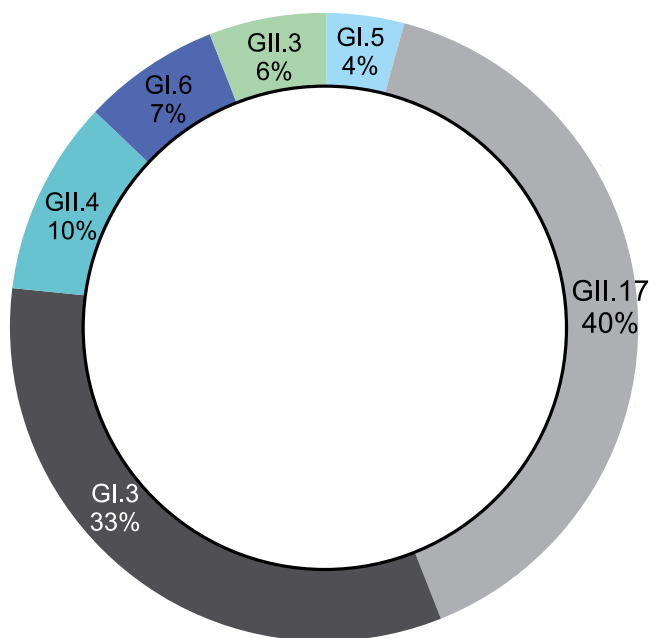


Рис. 2. Удельный вес возбудителей НВИ человека в Свердловской области за 2022 г.

Fig. 2. Distribution of different norovirus genogroups detected in the Sverdlovsk region in 2022.

При построении филогенетического дерева консенсусные последовательности GI.3 из Каменск-Уральского образуют общий кластер. Последовательности из кластера GI.3 образуют парафилиетическую группу с близкородственными генотипами из Бразилии, Японии и США.

Последовательности GII.17 из Нижнего Тагила, Екатеринбурга, Каменск-Уральского группируются в единый кластер. Последовательности из данного кластера образуют парафилиетическую группу с близкородственными генотипами из Китая (рис. 3).

Обсуждение

Из 220 исследованных образцов 197 были положительны на антиген норовируса в ИФА, 23 образца — в ПЦР. Полученный результат согласуется с данными предшествующего исследования, в котором была продемонстрирована низкая специфичность ИФА на антиген норовируса. Низкая специфичность может приводить к ложноположительному результату при определении генетической группы у норовирусов. Низкий процент типированных норовирусов может быть обусловлен высоким процентом ложноположительных результатов в биологических образцах, обнаруженных методом ИФА [15]. Из-за высокой частоты мутационных событий вторая генетическая группа занимает доминирующее положение в популяции норовирусов. В генотипической структуре возбудителей НВИ GII.4 является доминирующим генотипом с середины 1990-х гг. в США, Европе и Океании, вызывая

до 70–80% вспышек норовирусных гастроэнтеритов [16]. Молекулярно-генетический мониторинг возбудителей НВИ, а также обнаружение эволюционных событий на уровне вирусной популяции позволили подтвердить основную парадигму, в которой наиболее часто регистрируемой генотипической структурой норовирусов занимает группа GII (58%), норовирусы группы GI — 42%. Так, впервые за 2022 г. в Екатеринбурге, Нижнем Тагиле, Каменск-Уральском генотипический профиль и наибольший удельный вес представлены норовирусными генотипами GII.17 и GI.3. Наблюдается рост заболеваемости в отдельных регионах России рекомбинантным GII.3. Дальнейший мониторинг циркуляции норовирусов позволит отследить возможный рост рекомбинантного GII.3 на территории отдельных муниципалитетов в Свердловской области [18].

Идентифицированы редкие норовирусные генотипы, относящиеся к генотипической группе GI (GI.3, GI.5, GI.6, GI.7), которые были депонированы в GenBank. Филогенетический анализ продемонстрировал, что консенсусные последовательности норовирусов GI и GII из Екатеринбурга часто образуют парафилиетические группы с изолятами из Японии, Китая, Таиланда, США, что может свидетельствовать о наименьшей генетической дистанции между ними [9, 14, 16, 19–21]. Множество референсных изолятов норовирусов не кластеризуются и не образуют парафилиетические группы с последовательностями из Свердловской области, что, возможно, указывает на дивергентную эволюцию идентифицированных генотипов [22]. Организация молекулярно-генетического мониторинга и проведение филогенетического анализа предоставляют возможность объективно определять генетическую дистанцию между норовирусами и циркуляцию различных генотипов на эндемичных территориях, что способствует повышению эффективности работы основных подсистем эпидемиологического надзора.

Заключение

Впервые на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области проведен генетический анализ возбудителей НВИ. Система генотипирования норовирусов, основанная на амплификации региона ORF1/ORF2, позволяет успешно идентифицировать различные генотипы норовирусов. Генотипический профиль представлен норовирусами, которые относятся к генотипам GII.17 и GI.3. Консенсусные последовательности выявленных норовирусов демонстрируют наименьшую генетическую дистанцию с изолятами из Китая, Японии, США, Вьетнама, Таиланда, Бразилии, Новой Зеландии, что говорит об убиквитарности идентифицированных генотипов. Отсутствие данных о

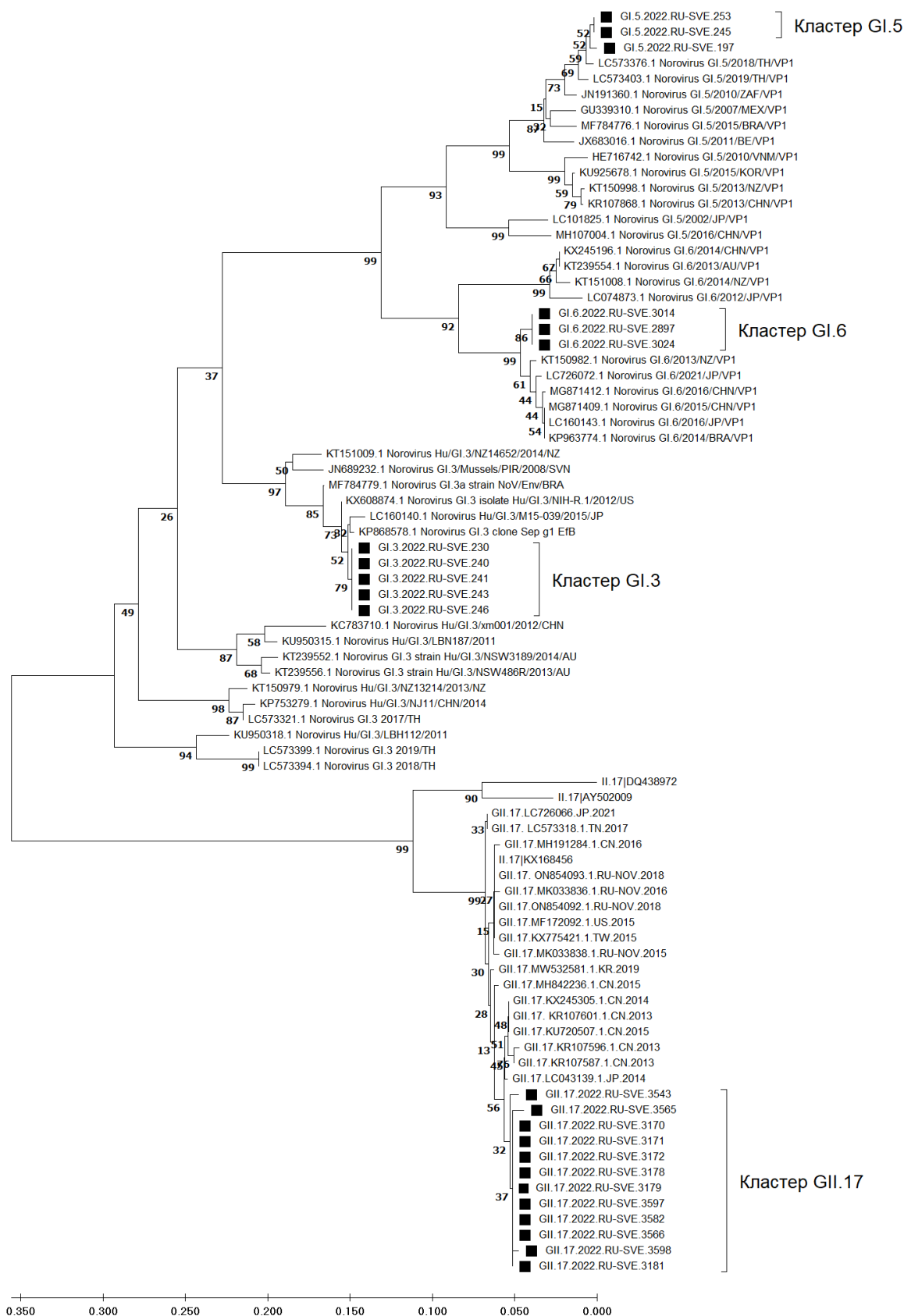


Рис. 3. Филогенетическое древо, основанное на фрагменте главного капсидного белка, построенное на основе нуклеотидных последовательностей норовирусных генотипов GI.5, GI.6, GI.3, GII.17.

Fig. 3. Phylogenetic tree based on the HuNoV viral protein 1 major capsid gene fragment, constructed based on nucleotide sequences of HuNoV genotypes GI.5, GI.6, GI.3, GII.17.

структуре генотипического профиля возбудителей НВИ на территории Екатеринбурга, Нижнего Тагила, Каменск-Уральского в прошлом позволяет предположить, что выявленные норовирусы могли циркулировать ранее. Дальнейшее применение представленной структуры генотипирования позволит с большей доступностью определять генетическое разнообразие возбудителей НВИ в Свердловской области. Организация надзорной деятельности за циркуляцией норовирусной популяции, секвенирование и филогенетический анализ последовательностей генома предоставят возможность анализировать возникшие гипотезы об общности источника возбудителя инфекции, а также определения возможных факторов передачи в очагах заболеваемости острым норовирусным гастроэнтеритом.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Епифанова Н.В., Луковникова Л.Б., Новикова Н.А. и др. Эпидемические варианты норовирусов генотипа GII.4 в Нижнем Новгороде в 2006–2012 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2014;(2):64–72. Epifanova N.V., Lukovnikova L.B., Novikova N.A., et al. Epidemic variants of norovirus genotype GII.4 in Nizhny Novgorod in 2006–2012. *Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*. 2014;(2):64–72. EDN: <https://elibrary.ru/tzjwjp>
2. Patel M.M., Widdowson M.A., Glass R.I., et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 2008;14(8):1224–31. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1408.071114>
3. Lopman B.A., Steele D., Kirkwood C.D., Parashar U.D. The vast and varied global burden of norovirus: prospects for prevention and control. *PLoS Med.* 2016;13(4):e1001999. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001999>
4. Bartsch S.M., Lopman B.A., Ozawa S., et al. Global economic burden of norovirus gastroenteritis. *PLoS One*. 2016;11(4):e0151219. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151219>
5. Prasad B.V., Shanker S., Muhaxhiri Z., et al. Chapter 3.1 – Structural biology of noroviruses. In: *Viral Gastroenteritis. Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. Elsevier;2016:329–54. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802241-2.00016-X>
6. Katayama H., Shirato-Horikoshi H., Kojima S., et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology*. 2002;299(2):225–39. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1568>
7. Graziano V.R., Wei J., Wilen C.B. Norovirus attachment and entry. *Viruses*. 2019;11(6):495. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11060495>
8. Chhabra P., de Graaf M., Parra G.I., et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J. Gen. Virol.* 2019;100(10):1393–406. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001318>
9. Bull R.A., Hansman G.S., Clancy L.E., et al. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg. Infect. Dis.* 2005;11(7):1079–85. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1107.041273>
10. Phan T.G., Kaneshi K., Ueda Y., et al. Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *J. Med. Virol.* 2007;79(9):1388–400. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.20924>
11. de Graaf M., van Beek J., Koopmans M.P. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016;14(7):421–33. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.48>
12. Pérez-Losada M., Arenas M., Galán J.C., et al. Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infect. Genet. Evol.* 2015;30:296–307. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.022>
13. Chen S.Y., Chiu C.H. Worldwide molecular epidemiology of norovirus infection. *Paediatr. Int. Child Health.* 2012;32(3):128–31. DOI: <https://doi.org/10.1179/204690512Y.0000000031>
14. Siebenga J.J., Vennema H., Zheng D.P., et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007. *J. Infect. Dis.* 2009;200(5):802–12. DOI: <https://doi.org/10.1086/605127>
15. Schmid M., Oehme R., Schallasta G., et al. Fast detection of noroviruses using a real-time PCR assay and automated sample preparation. *BMC Infect. Dis.* 2004;4:15. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-4-15>
16. Huhti L., Szakal E.D., Puustinen L., et al. Norovirus GII-4 causes a more severe gastroenteritis than other noroviruses in young children. *J. Infect. Dis.* 2011;203(10):1442–4. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jir039>
17. Epifanova N.V., Sashina T.A., Morozova O.V., et al. An increase in prevalence of recombinant GII.3[P12] norovirus in sporadic acute diarrhea in children in Nizhny Novgorod, Russia, 2018–2021. *Virus Genes*. 2022;58(5):467–72. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11262-022-01919-3>
18. Pires S.M., Fischer-Walker C.L., Lanata C.F., et al. Aetiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of diarrhoeal diseases commonly transmitted through food. *PLoS One*. 2015;10(12):e0142927. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142927>
19. Boon D., Mahar J.E., Abente E.J., et al. Comparative evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period. *J. Virol.* 2011;85(17):8656–66. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.00472-11>
20. Khamrin P., Kumthip K., Thongprachum A., et al. Genetic diversity of norovirus genogroup I, II, IV and sapovirus in environmental water in Thailand. *J. Infect. Public Health.* 2020;13(10):1481–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.05.004>
21. Moyo S., Hanevik K., Blomberg B., et al. Genetic diversity of norovirus in hospitalised diarrhoeic children and asymptomatic controls in Dar es Salaam, Tanzania. *Infect. Genet. Evol.* 2014;26:340–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.06.013>
22. Shen W., Sheng Y., Weng J., et al. Molecular epidemiology of norovirus associated with acute gastroenteritis in Taizhou, China: a retrospective study. *J. Infect. Public Health.* 2020;13(1):34–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.006>

Информация об авторах

Быков Роман Олегович[✉] — аспирант, м.н.с. лаб. энтеральных вирусных инфекций ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия, bykov_ro@niiviro.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3868-3225>

Скрябина Светлана Викторовна — начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Федеральной службы по над-

Information about the authors

Roman O. Bykov[✉] — postgraduate student, researcher, Laboratory of enteral viral infections, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections «Virome», Ekaterinburg, Russia, bykov_ro@niiviro.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3868-3225>

Svetlana V. Scriabina — Head, Epidemiological surveillance department, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protec-

зору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Свердловской области, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7182-6262>

Килиячина Анастасия Сергеевна — зав. лаб. контроля биологических факторов, врач-вирусолог Центра гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1751-3462>

Итани Тарек Мохамедович — к.б.н., зав. лаб. энтеральных вирусных инфекций ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2113-6543>

Чалапа Владислав Игоревич — н.с. лаб. энтеральных вирусных инфекций ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5823-5257>

Старикова Полина Константиновна — врач-эпидемиолог лаб. энтеральных вирусных инфекций ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7664-3059>

Колтунов Станислав Валерьевич — зав. отделом эпидемиологических экспертиз, врач-эпидемиолог Центра гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0009-0008-0881-7644>

Пономарева Анжелика Владимировна — заместитель руководителя Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Свердловской области, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8237-8335>

Семенов Александр Владимирович — д.б.н., директор ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия; профессор кафедры экспериментальной биологии и биотехнологии Института естественных наук и математики Уральского федерального университета имени Первого президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

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 15.05.2023;
принята к публикации 23.07.2023;
опубликована 28.08.2023

tion and Human Wellbeing in the Sverdlovsk Region, Ekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7182-6262>

Anastasia S. Kilyachina — Head, Laboratory of biological factors control, virologist, Center for Hygiene and Epidemiology in the Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1751-3462>

Tarek M. Itani — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of enteral viral infections, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections «Virome», Ekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2113-6543>

Vladislav I. Chalapa — researcher, Laboratory of enteral viral infections, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections «Virome», Ekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5823-5257>

Polina K. Starikova — epidemiologist, Laboratory of enteral viral infections, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections «Virome», Ekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7664-3059>

Stanislav V. Koltunov — Head, Department of epidemiological examinations, epidemiologist, Center for Hygiene and Epidemiology in the Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0009-0008-0881-7644>

Angelika V. Ponomareva — Deputy head, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Sverdlovsk Region, Ekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8237-8335>

Aleksandr V. Semenov — D. Sci. (Biol.), Director, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections «Virome», Ekaterinburg, Russia; Professor, Department of experimental biology and biotechnology, Institute of Natural Sciences and Mathematics, Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

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 15.05.2023;
accepted for publication 23.07.2023;
published 28.08.2023

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-406>

Analysis of entomological indicators and distribution of *Aedes aegypti* larvae in dengue endemic areas

Agung Sutriyawan^{1✉}, Abdul Manap², Neti Sulami³, Agung Setiyadi⁴,
Dian Mariza Riskiah³, Ratna Dian Kurniawati¹, Khariri Khariri⁵

¹Bhakti Kencana University, Bandung, Indonesia;

²University of Jayabaya, Jakarta, Indonesia;

³Midwifery Academy of Surya Mandiri Bima, Bima, Indonesia;

⁴Binawan University, Jakarta, Indonesia;

⁵National Research and Innovation Agency, Jakarta, Indonesia

Abstract

Background. The cause of dengue fever's endemicity is vector larvae density, with *Aedes aegypti* as the prime vector. Bandung municipality is a high dengue fever endemic area. Hence, studying the habitat characteristics of the *Aedes* mosquito is essential to controlling the populations of mosquitos.

Purpose. This study aimed to identify the aedes larvae breeding sites and the relationship between the breeding risk index, hygiene risk index, maya index, and the existence of larvae with the incidence of dengue fever.

Method. The design used in this research was a cross-sectional survey. The sampling technique used simple random sampling. The quantity of the sample was 544 directly observed houses.

Results. The entomological parameters obtained were house index (23.89%), container index (7.81%), Breteau index (50.73%), and larva free number (76.10%). The breeding risk index, hygiene risk index, and maya index are in the low category. The chi-square test conveyed that the breeding risk index, maya index, and the existence of larvae were significantly associated with the incidence of dengue fever.

Conclusion. The entomological index may influence the high incidence of dengue fever. These findings and results may help the authorities to improve mosquito nest eradication in attempts to prevent dengue transmission.

Keywords: *Dengue, Aedes aegypti, Dengue transmission, Entomology Index, Mosquito larvae*

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: Sutriyawan A., Manap A., Sulami N., Setiyadi A., Mariza Riskiah D., Kurniawati Ratna D., Khariri K. Analysis of entomological indicators and distribution of *Aedes aegypti* larvae in dengue endemic areas. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(4):314–320.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-406>

EDN: <https://www.elibrary.ru/rjjnhz>

Оригинальное исследование

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-406>

Анализ энтомологических показателей и распространение личинок *Aedes aegypti* в эндемичных по лихорадке денге районах

Agung Sutriyawan^{1✉}, Abdul Manap², Neti Sulami³, Agung Setiyadi⁴,
Dian Mariza Riskiah³, Ratna Dian Kurniawati¹, Khariri Khariri⁵

¹Bhakti Kencana University, Bandung, Indonesia;

²University of Jayabaya, Jakarta, Indonesia;

³Midwifery Academy of Surya Mandiri Bima, Bima, Indonesia;

⁴Binawan University, Jakarta, Indonesia;

⁵National Research and Innovation Agency, Jakarta, Indonesia

Аннотация

Введение. Причиной эндемичности лихорадки денге является плотность популяции личинок комаров-переносчиков, основным из которых являются *Aedes aegypti*. Муниципалитет Бандунг является эндемичным районом с высоким уровнем заболеваемости лихорадкой денге. Следовательно, изучение характеристик среды обитания комаров рода *Aedes* имеет важное значение для контроля популяций комаров.

Целью данного исследования было выявление мест размножения личинок комаров рода *Aedes* и взаимосвязь между индексом риска размножения, индексом гигиенического риска, индексом Майя и наличием личинок с заболеваемостью лихорадкой денге.

Материалы и методы. В данном исследовании использовался метод перекрёстного опроса. Объём простой случайной выборки составил 544 дома.

Результаты. Полученными энтомологическими показателями были индекс дома (23,89%), индекс контейнера (7,81%), индекс Брето (50,73%) и количество объектов, свободных от личинок (76,10%). Индекс риска размножения, индекс гигиенического риска и индекс Майя относятся к низкой категории. Тест χ^2 показал, что индекс риска размножения, индекс Майя и наличие личинок были в значительной степени связаны с заболеваемостью лихорадкой денге.

Заключение. Энтомологический индекс может влиять на высокую заболеваемость лихорадкой денге. Эти выводы и результаты могут помочь властям оптимизировать программу по ликвидации мест размножения комаров с целью предотвратить распространение лихорадки денге.

Ключевые слова: лихорадка денге, *Aedes aegypti*, распространение лихорадки денге, энтомологический индекс, личинки комаров

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: Sutriyawan A., Manap A., Sulami N., Setiyadi A., Mariza Riskiah D., Kurniawati Ratna D., Khari-ri K. Analysis of entomological indicators and distribution of *Aedes aegypti* larvae in dengue endemic areas. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):314–320.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-406>. EDN: <https://www.elibrary.ru/rjnhz>

Introduction

Dengue is still a global public health issue, particularly in tropical and subtropical areas, including Indonesia as one of the dengue endemic countries [1]. Dengue is a disease caused by the dengue virus which has the fastest spread worldwide [2]. The global incidence of dengue has risen significantly, with approximately half of the world's population at risk. Although an estimated 100–400 million infections occur yearly, more than 80% are generally milder and asymptomatic¹.

Dengue is a disease which causes death due to bleeding and hemodynamic disorders. The primary vector of dengue is the *Aedes aegypti* mosquito, whereas the potential vector is *Ae. albopictus*. These mosquitoes are also vectors of chikungunya, yellow fever, and zika virus [3]. Specific medicines and vaccines that are efficacious for dengue are still under investigation, since no particular drug is efficacious in the treatment of dengue [4].

Indonesia is a dengue-endemic country. 248,127 cases were reported in 2019. Meanwhile, until July 2020, the number of cases had reached 71,633 cases². An epidemiological study of dengue fever in Bandung Municipality stated that the existence of *Ae. aegypti* mosquito larvae highly influences the high number of infection cases [5]. Prevention and management of den-

gue fever depends on effective vector control measures. Sustained community involvement can substantially improve vector control efforts.

Multiple factors have been implicated in the global resurgence of dengue fever. These include failure to control aedes populations, uncontrolled urbanization, and unprecedented population growth [6]. The seasonal dynamics of *Ae. aegypti* population sizes generally have a positive relationship with climatic variables such as temperature, rainfall, and relative humidity [7]. Previous studies have indicated that the distribution pattern of dengue can be affected by various factors, one of which is the existence of mosquito vectors that can be assessed through entomological indexes such as: House Index (HI), Container Index (CI), Breteau Index (BI), and Mosquito larva Free Rate (ABJ). High dengue disease transmission is encouraged by the high density of *Ae. aegypti* mosquitoes [7, 8].

Current prevention efforts include Mosquito Nest Eradication (Pemberantasan Sarang Nyamuk, or PSN), but implementation still needs to be optimized. One of the efforts that have proven effective is to reduce and suppress the mosquito population. WHO states that effective dengue prevention is achievable by controlling vectors from larvae to adult mosquitoes [9]. In dengue eradication programs, the typical larval survey is the investigation of *Ae. aegypti* larvae in residential and communal areas using the single larva method [10].

With an increasing tendency of dengue incidence, especially in Bandung Municipalities, the research focus has been on case tracing and control of *Ae. aegypti*.

¹ WHO. Dengue and severe dengue; 2023. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

² Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Kemenkes R.I. Profil Kesehatan Indonesia 2020. Jakarta;2021. URL: <https://www.kemkes.go.id/downloads/resources/download/pusdatin/profil-kesehatan-indonesia/Profil-Kesehatan-Indonesia-Tahun-2020.pdf>

Therefore, there is a need to conduct a study of distribution patterns based on entomological indicators. This program will be very useful when used as basic literature. It can also form the basis for making vector control policies more precisely targeted in an effort to prevent dengue fever. Vector population density can help programs determine the rate of speed of the dengue virus spread in a particular area [11]. This research aims to identify the breeding sites of *Aedes* larvae and the association of the Breeding risk index (BRI), Hygiene risk index (HRI), Maya index (MI), and the occurrence of larvae with the incidence of dengue fever. The findings of this research can serve as a foundation for dengue fever prevention efforts through effective mosquito nest eradication efforts.

Materials and methods

Research design

This research used a cross-sectional design. This study was conducted in Bandung City in March–July 2022. This study surveyed each endemic area. Each stratification selected nine sub-districts based on a purposive sampling design.

Sampling technique

The population in this research was heads of households from all residents of Bandung City. The sample selection of endemic sub-districts was based on sub-districts with the highest number of cases by considering existing incidence rate data and stratification based on the Bandung City health office in 2021. 544 houses were taken using the Sample Size for One Sample Test of Proportion formula (level of significance 5%, power 90%). The sample houses were chosen using a random sampling method from the combined list of residents owned by each sub-district. A house was sampled, if selected as a sample and willing to be visited.

Entomology survey

Surveys were conducted on larvae by examining all water storage containers accessible from respondents' homes, in order to determine the most effective and efficient types of containers for mosquito breeding. Surveys were conducted on wet containers filled with water at the time of the survey. Samples of larvae found were collected using a net (tea strainer) and then placed in small plastic jars filled with water. Each sample jar was labeled with the identification number, date, location, and number of larvae gathered. Breeding sites of the mosquito species collected were recorded in pre-determined survey data sheets during sample collection. Containers were recorded as positive for *Aedes*, if larvae were found in the water storage containers.

Containers classification

Containers were categorized into three groups based on their purpose: Controllable containers, dis-

posable containers, and under-controllable containers. Water storage containers recorded in the survey as controlled containers are places that can be maintained or controlled, such as bathtubs, water tanks, buckets, jerry cans, wells, flowerpots, drums, refrigerators, dispensers, barrels, animal drinkers, crocks and gutters. Used containers are waste or places that are no longer used, such as used cans, tires, bottles, buckets, jars, glasses, and drums. Furthermore, containers such as fishponds and aquariums were deemed under-controllable.

Larvae identification

After being collected, the larvae were taken to the parasitology laboratory of Bhakti Kencana University. The larvae were identified under a microscope in the laboratory. Species identification was finalized using standard identification keys explained in the literature "Pictorial keys for identifying mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) associated with Dengue Virus Transmission" [12]. Furthermore, laboratory results were then recorded on the appropriate survey sheet.

Data analysis

Maya index and entomological index analysis were used to illustrate the transmission risk of dengue. Dominant containers were identified by data collection on the containers with the highest number of positive larvae found inside and outside the house. Containers in this regard were grouped into two categories: controlled containers and used containers. The Maya Index in this research was determined using two indicators: BRI and HRI. BRI is each house's proportion of controllable sites. BRI is obtained by dividing the number of controllable areas examined by the average number of containers in the house. The HRI is each house's proportion of disposable sites. HRI is calculated by dividing the number of disposable sites in the examined homes by the average number of containers in the home [13]. BRI, HRI, and MI values were classified into three categories: high, medium, and low, based on Lozano's distribution (2002). MI is determined from the BRI and HRI values in each house arranged in a 3×3 matrix [14].

Entomological indicators, namely HI, CI, and BI, are categorized based on the larval density index according to the density figure (DF) value in the low, medium, and high categories [17]. CI is an index used to define the number of larvae-positive containers out of all containers examined (Number of larvae-positive containers \times 100% / Number of containers discussed). HI is an index used to identify the number of larvae-positive houses out of all homes inspected (Number of larvae-positive homes \times 100% / Number of homes inspected). BI is an index used to determine how many larvae-positive containers out of all the homes examined (Number of larvae-positive containers \times 100% / Number of homes examined). The entomological index defines the risk of infection based on DF. The low

Table 1. Density of *Aedes Aegypti* Larvae Based on DF and Indicators of HI, CI, and BI

DF	HI	CI	BI
1	1–3	1–2	1–4
2	4–7	3–5	5–9
3	8–17	6–9	10–19
4	18–29	10–14	20–34
5	30–37	15–20	35–49
6	38–49	21–27	50–74
7	50–59	28–31	75–99
8	60–76	32–40	100–199
9	–	–	–

Source: Service, MW. Mosquito Ecology Field Sampling Methods. Chapman and Hal.

density is categorized as DF 1, medium density as DF 2–5, and high density as DF 6–9 [11]. The determination of the density of index larvae based on HI, CI, and BI taken from the MW Service can be seen in **Table 1**. MI analysis is determined by identifying controlled and uncontrolled water reservoirs, namely the categories of controllable sites and disposable sites.

The Chi-Square test was used for further analysis. This test was used to analyze the relationship between the Maya index and the occurrence of larvae with the dengue incidence, with a significance level of 5%.

Results

This study was conducted on 544 homes and resulted in an incidence rate of 41% (**Fig. 1**). The elevation of dengue incidence is relevant to the number of larvae found in the houses. A total of 276 containers containing larvae were found. The majority of mosquito larvae were found in bathtubs (52), dispensers (40), refrigerators (30), buckets (24), bottles (23), and used tires (13). At the same time, wells, barrels, crocks, used

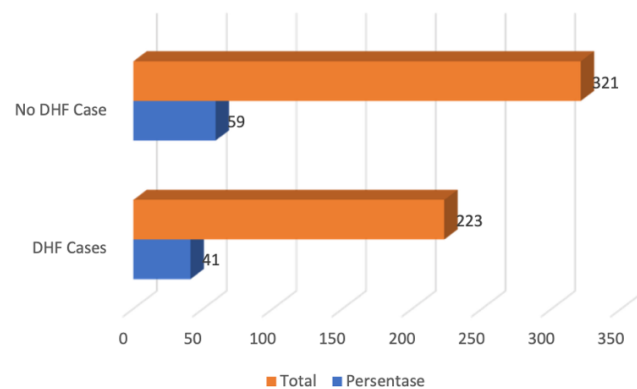


Fig. 1. Prevalence of dengue in Bandung municipality.

jars, used cups, used drums, fishponds, and aquariums were not found with any larvae at all. Most mosquito larvae were found in controllable containers (**Fig. 2**).

The MI status is based on potential mosquito breeding sites (BRI) and environmental cleanliness (HRI). MI analysis (**Table 2**) conveys that BRI, HRI, and MI values di Kota Bandung are primarily in the low category.

Entomological indicators in the form of index measurement of *Aedes aegypti* larval density in particular settlements are essential considerations in effective vector control. **Table 3** shows that the HI was 23.89%, the CI was 7.81%, the BI was 50.73%, and ABJ was 76.10%.

The effect of the Entomology Index on dengue incidence in Bandung Municipality can be seen in **Table 4**. BRI is a factor that affects the elevation in dengue cases ($p = 0,001$). MI is a factor that influences the peak of dengue cases ($p = 0,001$). The presence of larvae is also a factor that causes an increase in dengue cases in Bandung municipality ($p = 0,000$). Meanwhile, the writer concludes that HRI could not be proven to influence the increase in dengue cases.

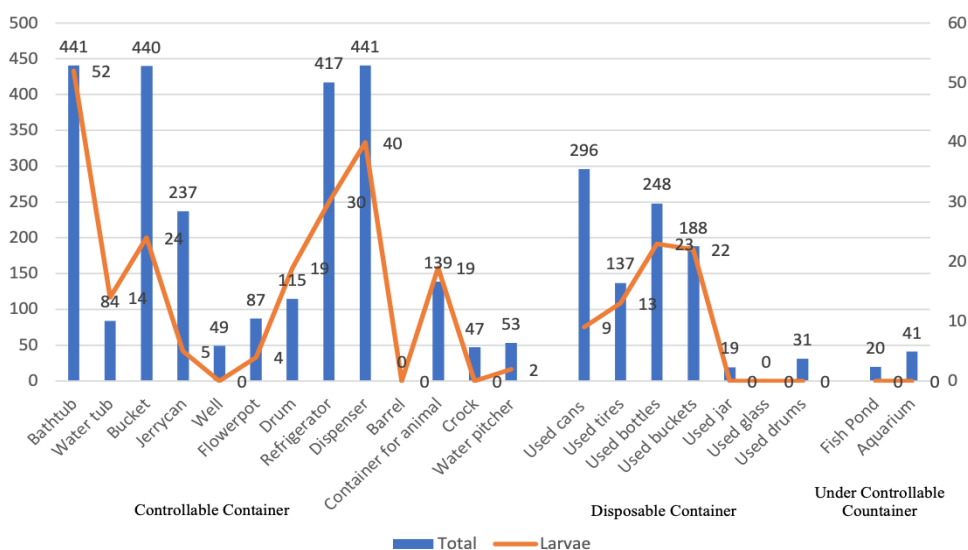


Fig. 2. Containers varieties on households in Bbandung municipality.

Table 2. The proportion of households based on the Breeding Risk Index (BRI), Hygiene Risk Index (HRI), and Maya Index (MI) in Bandung municipality

Category	BRI		HRI		MI	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Low	428	78.7	491	90.3	420	77.2
Medium	7	1.3	7	1.3	83	15.3
High	109	20	46	8.5	41	7.5
Total	544	100	544	100	544	100

Table 3. Entomological Index

Entomological Index	Result, %	DF
House Index	23,89	4
Container Index	7,81	3
Breteau Index	50,73	6
Larvae Free Number	76,10	

Discussion

Common breeding sites observed in the study area were bathtubs, dispensers, refrigerators, barrels, and used plastic. Most residents in Bandung municipality store tap water and rainwater in containers for household necessities. Based on the research results, the incidence of dengue in Bandung City is quite inflated. This result is relevant to the data of dengue in Indonesia. Over a 50-year period, there has been a sharp increase in the annual IR of dengue in Indonesia, from only 0.05 cases per 100,000 person-years in 1968 to 77.96 cases per 100,000 person-years in 2016 [2]. The elevation of dengue cases in Bandung Municipality is reciprocal to the high number of mosquito larvae found. Thus, the

writer examined different containers in respondents' homes in Bandung Municipality and identified *Aedes aegypti* larvae and pupae. These findings are consistent with previous studies or research [16, 17]. A significant number of *Aedes aegypti* larvae were found, since the study site was in an urban area. Findings in Southern Taiwan show that *Aedes aegypti* almost exclusively exists in urban areas [18]. While the conclusions from a study in East Ethiopia from 405 containers were positive for mosquito larvae, 84.4% were identified as *Aedes aegypti* [19].

Nevertheless, in our research, *Aedes aegypti* was found to be the most dominant species to breed in artificial containers. Many containers are located near human habitation and are potentially more durable than natural containers [20]. In our research, no *Anopheles* mosquito larvae were found. Nonetheless, *Anopheles* mosquitoes inhabit old tires in Nicholas County, West Virginia [21]. The type of container, water quality, and condition of the water container are important for breeding³.

HI, CI, BI, and ABJ were relatively low. These findings are consistent and in line with the study that sta-

Table 4. The effect of Entomological Index on the incidence of dengue

Entomological Index	No Dengue		Dengue		Total		<i>p</i> -value
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Breeding Risk Index (BRI)							0,001
low	235	54,9	193	45,1	428	100	
medium	6	85,7	1	14,3	7	100	
high	80	73,4	29	26,6	109	100	
Hygiene Risk index (HRI)							0,378
low	285	58,0	206	42,0	491	100	
medium	5	71,4	2	28,6	7	100	
high	31	67,4	15	32,6	46	100	
Maya Index (MI)							0,001
low	231	55,0	189	45,0	420	100	
medium	63	75,9	20	24,1	83	100	
high	27	65,9	14	34,1	41	100	
Presence of Larvae							0,000
absent	224	54,1	190	45,9	414	100	
present	97	74,6	33	25,3	130	100	

³ WHO. Chen C.D., Lee H.L., Stella-Wong S.P., et al. Container survey of mosquito breeding sites in a university campus in Kuala Lumpur, Malaysia; 2009. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/170721>

ted an overall HI of 14.2%, BI of 24.65, and CI of 5.9% [22]. All indices indicate a high level of risk of dengue transmission. A survey in Nepal found CI to be higher in the transitional period than in the rainy season [17]. A recent study in Malaysia conveyed maximum HI = 13.33%, BI = 13, dan CI = 19.05% [23]. In the literature, it has been criticized that this index needs more operational value and usage in assessing transmission risk. However, this index indicates a threat of global transmission at the community level [17]. The majority of *Aedes aegypti* larvae were found inside the respondents' homes. In accordance with findings in Southern Mexico, the frequency of larval populations was higher inside the households (14.1%) compared to containers found outdoors (5.1%) [24]. The writers found the most *Aedes aegypti* larvae in bathtubs, comparably with findings in Thailand that stated the most important risk factors for the existence of *Aedes aegypti* were container type (jars and tanks), location (toilet/bathroom), and lid status (no lid or covering) [25].

Amongst the risk factors for dengue incidence is the MI. In order to obtain the MI, the BRI and HRI were first calculated using the Miller formula [26]. The writers found that MI was in a low category. Another study in Tegal City stated that there was no difference between low and medium index MI categories. Thus, houses with low and medium index status have the equivalent risk of dengue infection [27]. The writers found that the most frequently controlled containers were bathtubs, buckets, jerry cans, refrigerators, dispensers, animal drinkers, and drums. Research in Semarang conveyed that mosquito larvae were primarily found in flowerpots and buckets, while those who suffered from dengue found the most mosquito larvae in bathtubs [28].

In this finding, BRI is in a low category, meaning that the danger as a mosquito breeding site is insufficient. This is consistent with other findings stating that the city is at low risk of mosquito breeding [29, 30]. Another research in Central Java found that BRI was at medium risk [31]. Several larvae were found in controlled containers, and all of them were *Aedes aegypti* larvae. The study in Eastern Ethiopia stated that the mosquito larvae-positive containers were mostly artificial water storage containers located outdoors (93.06%), open or partially covered (87.6%), and fully or partially exposed to sunlight (67.86%) [19].

The existence of mosquito larvae in the home can elevate the risk of dengue transmission. If there are mosquito larvae around the house, either indoors or outdoors, it will increase the risk of dengue infection. A study in Japan indicated that the highest number of wet containers were outdoors (56.5%), followed by indoors (32.2%) and roofs (11.3%). Among outdoor containers, 7.8% of containers were found to be overrun with *Aedes* larvae. Among indoor and rooftop containers, 3.1% and 3.9% of containers were found positive, respectively. The overall HI was 14.2. BI was 24.6,

and the CI was 5.9 [23]. All indexes showed that the transmission risk rate is currently high [32, 33]. So it is necessary to elevate efforts to prevent dengue by implementing mosquito nest eradication.

Conclusion


The study detected larval density based on entomological indices in the medium and high categories. BRI, MI, and larval occurrence can significantly elevate the incidence of dengue fever in Bandung Municipality. The writers suggest dengue vector control through routine inspection and destruction of potential container types both inside and outside the house as a preventive measure for dengue fever transmission.

REFERENCES

1. Lesmana S.D., Maryanti E., Susanty E., et al. Organophosphate resistance in *Aedes aegypti*: study from dengue hemorrhagic fever endemic subdistrict in Riau, Indonesia. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 2022;10(4):589–96. DOI: <https://doi.org/10.52547/rbmb.10.4.589>
2. Harapan H., Michie A., Mudatsir M., et al. Epidemiology of dengue hemorrhagic fever in Indonesia: analysis of five decades data from the National Disease Surveillance. *BMC Res. Notes.* 2019;12(1):350. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4379-9>
3. Kraemer M.U.G., Sinka M.E., Duda K.A., et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife.* 2015;4:e08347. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
4. Deng S.Q., Yang X., Wei Y., et al. A review on dengue vaccine development. *Vaccines (Basel).* 2020;8(1):63. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines8010063>
5. Sutriyawan A., Herdianti H., Cakranegara P.A., et al. Predictive index using receiver operating characteristic and trend analysis of dengue hemorrhagic fever incidence. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* 2022;10(E):681–7. DOI: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2022.8975>
6. Kampango A., Furu P., Sarath D.L., et al. Risk factors for occurrence and abundance of *Aedes aegypti* and *Aedes bromeliae* at hotel compounds in Zanzibar. *Parasit. Vectors.* 2021;14(1):544. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05005-9>
7. Rahayu A., Saraswati U., Supriyati E., et al. Prevalence and distribution of dengue virus in *Aedes aegypti* in Yogyakarta city before deployment of Wolbachia infected *Aedes aegypti*. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2019;16(10):1742. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph16101742>
8. Handayani M.T., Raharjo M., Joko T. Pengaruh Indeks Entomologi dan Sebaran Kasus Demam Berdarah Dengue di Kabupaten Sukoharjo. *J. kesehat. lingkungan. Indones.* 2023;22(1):46–54. DOI: <https://doi.org/10.14710/jkli.22.1.46-54>
9. Fuadzy H., Hendri J. Indeks entomologi dan kerentanan larva *Aedes aegypti* terhadap temefos di Kelurahan Karsamenak Kecamatan Kawalu Kota Tasikmalaya. *Vektora: Jurnal Vektor dan Reservoir Penyakit.* 2015;7(2):57–64.
10. Prasetyowati H. Gambaran Maya Indeks dan Kepadatan Larva di Daerah Endemis Dbd Jakarta Timur. *Vektora: Jurnal Vektor dan Reservoir Penyakit.* 2017;9(1):43–9.
11. Hartati R., Satoto T.B.T., Murhandarwati E.H., Widawati M. Analisis Indikator Entomologi dan Sebaran Jentik *Aedes aegypti* pada Daerah Stratifi kasi Endemisitas Demam Berdarah Dengue di Kota Jayapura. *ASPIRATOR J. Vector Borne Dis. Stud.* 2021;13(2):127–36. DOI: <https://doi.org/10.22435/asp.v13i2.4441>

12. Rueda L.M. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission. *Zootaxa*. 2004;589(1). DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.589.1.1>
13. Halstead S.B. Community-based dengue control: a description and critique of the Rockefeller Foundation Program. *Trop. Med.* 1994;35(4):285–91.
14. Danis-Lozano R., Rodríguez M.H., Hernández-Avila M. Gender-related family head schooling and *Aedes aegypti* larval breeding risk in Southern Mexico. *Salud Publica Mex.* 2002;44(3):237–42. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0036-36342002000300007>
15. Guzman M.G., Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015;385(9966):453–65. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60572-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60572-9)
16. Dhar-Chowdhury P., Haque C.E., Lindsay R., Hossain S. Socioeconomic and ecological factors influencing *Aedes aegypti* prevalence, abundance, and distribution in Dhaka, Bangladesh. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2016;94(6):1223–33. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0639>
17. Rahman M., Faruk M., Tanjila S., et al. Entomological survey for identification of *Aedes larval* breeding sites and their distribution in Chattogram, Bangladesh. *Beni Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* 2021;10(1):1–11. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43088-021-00122-x>
18. Lin C.H., Schiøler K.L., Ekstrøm C.T., et al. Location, seasonal, and functional characteristics of water holding containers with juvenile and pupal *Aedes aegypti* in Southern Taiwan: A cross-sectional study using hurdle model analyses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018;12(10):e0006882. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006882>
19. Getachew D., Tekie H., Gebre-Michael T., et al. Breeding sites of *Aedes aegypti*: potential dengue vectors in Dire Dawa, East Ethiopia. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2015;2015:706276. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/706276>
20. Yee D.A., Kneitel J.M., Juliano S.A. Environmental correlates of abundances of mosquito species and stages in discarded vehicle tires. *J. Med. Entomol.* 2010;47(1):53–62. DOI: <https://doi.org/10.1093/jmedent/47.1.53>
21. Joy J.E., Hanna A.A., Kennedy B.A. Spatial and temporal variation in the mosquitoes (Diptera: Culicidae) inhabiting waste tires in Nicholas County, West Virginia. *J. Med. Entomol.* 2003;40(1):73–7. DOI: <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.1.73>
22. Ferdousi F., Yoshimatsu S., Ma E., et al. Identification of essential containers for *Aedes larval* breeding to control dengue in Dhaka, Bangladesh. *Trop. Med. Health.* 2015;43(4):253–64. DOI: <https://doi.org/10.2149/tmh.2015-16>
23. Mahmud M.A.F., Motalip M.H., Lodz N.A., Shahar H. Study on key *Aedes* spp breeding containers in dengue outbreak localities in Cheras district, Kuala Lumpur. *Int. J. Mosq. Res.* 2018;5(2):23–30.
24. Valdez-Delgado K.M., Moo-Llanes D.A., Danis-Lozano R., et al. Field effectiveness of drones to identify potential *Aedes aegypti* breeding sites in household environments from Tapachula, a dengue-endemic city in southern Mexico. *Insects.* 2021;12(8):663. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects12080663>
25. Vannavong N., Seidu R., Stenström T.A., et al. Effects of socio-demographic characteristics and household water management on *Aedes aegypti* production in suburban and rural villages in Laos and Thailand. *Parasit. Vectors.* 2017;10(1):170. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2107-7>
26. Miller J.E., Martínez-Balanzar A., Gazga-Salinas D. Where *Aedes aegypti* live in Guerrero; using the Maya index to measure breeding risk. In: *Dengue: A Worldwide Problem, a Common Strategy*. México;1992:311–7.
27. Rokhmawanti N., Ginanadjar P., Martini M. Hubungan Maya Index dengan Kejadian Demam Berdarah Dengue di Kelurahan Tegalsari Kota Tegal. *Jurnal Kesehatan Masyarakat Universitas Diponegoro.* 2015;3(1):162–70. DOI: <https://doi.org/10.14710/jkm.v3i1.11339>
28. Dewi A.A.K., Sukendra D.M. Maya Index dan Karakteristik Lingkungan Area Rumah dengan Kejadian Demam Berdarah Dengue. *HIGEIA J. Publ. Health Res. Dev.* 2018;2(4):531–42. DOI: <https://doi.org/10.15294/higeia.v2i4.24699>
29. Udayanga L., Gunathilaka N., Iqbal M.C.M., et al. Empirical optimization of risk thresholds for dengue: an approach towards entomological management of *Aedes mosquitoes* based on larval indices in the Kandy District of Sri Lanka. *Parasit. Vectors.* 2018;11(1):368. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2961-y>
30. Muñoz-Sánchez V., Valdez-Delgado K.M., Hernandez-Lopez F.J., et al. Use of unmanned aerial vehicles for building a house risk index of mosquito-borne viral diseases. *Machines.* 2022;10(12):1161. DOI: <https://doi.org/10.3390/machines10121161>
31. Pascawati N.A., Songjanaan E.P., Satoto T.B.T., Deta E. Improvement to early warning system of DHF transmission through controlling vector breeding places of *Aedes* sp. in Klaten District, Central Java. *J. Publ. Health Trop. Coast. Reg.* 2018;1(1):20–6. DOI: <https://doi.org/10.14710/jphtcr.v1i1.3245>
32. Mboera L.E.G., Mwera C.N., Rumisha S.F., et al. The risk of dengue virus transmission in Dar es Salaam, Tanzania during an epidemic period of 2014. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10(1):e0004313. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004313>
33. Barbosa G.L., Donalísio M.R., Stephan C., et al. Spatial distribution of the risk of dengue and the entomological indicators in Sumaré, State of São Paulo, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014;8(5):e2873. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002873>

Information about the authors

Agung Sutriawan  — researcher, Head, Department of public health, Faculty of health sciences, Bhakti Kencana University, Bandung, West Java, Indonesia, agung.sutriawan@bku.ac.id, <https://orcid.org/0000-0002-6119-6073>

Abdul Manap — senior researcher, Department of management, Faculty of economics and business, University of Jayabaya, Jakarta, Indonesia, <https://orcid.org/0009-0005-1788-4118>

Neti Sulami — researcher, Department of midwifery, Midwifery Academy of Surya Mandiri Bima, Bima, West Nusa Tenggara, Indonesia. <https://orcid.org/0000-0003-3446-3153>

Agung Setiyadi — researcher, Department of nursing, Faculty of nursing and midwifery, Binawan University, Jakarta, Indonesia, <https://orcid.org/0000-0001-8338-1803>

Dian Mariza Riskiah — researcher, Department of midwifery, Midwifery Academy of Surya Mandiri Bima, Bima, West Nusa Tenggara, Indonesia, <https://orcid.org/0009-0006-4192-595X>

Ratna Dian Kurniawati — senior researcher, Dean, Faculty of health sciences, Bhakti Kencana University, Bandung, West Java, Indonesia, <https://orcid.org/0000-0002-7042-3696>

Khairi Khariri — researcher, Faculty of medicine, University of Indonesia. Member of National Research and Innovation Agency, Jakarta, Indonesia, <https://orcid.org/0000-0003-2794-774X>

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.



Антибиотикорезистентность и вирулентность карбапенем-устойчивых штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у детей в реанимационных и хирургических отделениях

Новикова И.Е.^{1✉}, Садеева З.З.¹, Алябьева Н.М.¹, Самойлова Е.А.¹, Карасева О.В.^{1,2}, Янюшкина О.Г.², Лазарева А.В.¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Россия;

²Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Инфекции, ассоциированные с карбапенемрезистентной (Карба-Р) *Klebsiella pneumoniae* (КР), представляют собой серьезную проблему здравоохранения, поскольку приводят к увеличению длительности пребывания в стационаре, затрат на лечение, повышению заболеваемости и смертности пациентов.

Цель — охарактеризовать антибиотикорезистентность, вирулентные свойства и генотипы Карба-Р-штаммов КР, выделенных от пациентов, находившихся в реанимационных и хирургических отделениях.

Материалы и методы. В 2018–2020 гг. было собрано 455 штаммов КР, не чувствительных к меропенему и/или имипенему либо чувствительных к меропенему и/или имипенему при увеличенной экспозиции. Для дальнейшего исследования было отобрано 90 изолятов КР, выделенных из клинически значимых локусов: крови/ликвора/мочи/нижних дыхательных путей/ран/брюшной полости пациентов реанимационных и хирургических отделений. Чувствительность к антимикробным препаратам определяли методом микроразведений в бульоне. Гены карбапенемаз детектировали методом ПЦР в режиме реального времени. Гены вирулентности и принадлежность к K1/K2-капсульным серотипам определяли методом мультиплексной ПЦР. Сиквенс-типы (ST) были определены с помощью мультилокусного сиквенс-типирования.

Результаты. Большинство отобранных штаммов (97%) продемонстрировали фенотип широкой лекарственной устойчивости, 3 изолята обладали фенотипом множественной лекарственной устойчивости. Главной детерминантой резистентности была карбапенемаза группы OXA-48 (53%), у 13% штаммов выявлена металло-бета-лактамаза группы NDM, сочетание карбапенемаз NDM и OXA-48 обнаружено у 31% изолятов. Два штамма обладали карбапенемазой группы KPC. У большинства изолятов встречались гены вирулентности *entB* (100%), *mrkD* (99%) и *ybtS* (78%). У 16% штаммов был найден ген *iutA*. Четыре изолята показали наличие генов *kfu*, и у 4 штаммов был найден ген *rmpA*. К серотипу K2 принадлежали 13% изолятов. В исследованной популяции преобладали ST: ST395 (26%), ST2975 (19%), ST198 (12%) и ST307 (11%).

Заключение. Карба-Р-изоляты КР имели высокий уровень устойчивости не только к карбапенемам, но и к антибиотикам других классов. Устойчивость к карбапенемам главным образом была обусловлена карбапенемазой OXA-48. Главными детерминантами вирулентности были *entB*, *mrkD* и *ybtS*. Преобладающими генетическими линиями были эпидемически успешные клоны CG395 и CG307. Резистентность к антимикробным препаратам сочеталась с наличием различных факторов вирулентности. Полученные данные важны для эпиднадзора за распространением КР и имеют важное клиническое значение.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, вирулентность

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов и их законных представителей. Протокол исследования одобрен Локальным независимым этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра здоровья детей (протокол № 5 от 02.06.2022).

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: Новикова И.Е., Садеева З.З., Алябьева Н.М., Самойлова Е.А., Карасева О.В., Янюшкина О.Г., Лазарева А.В. Антибиотикорезистентность и вирулентность карбапенем-устойчивых штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у детей в реанимационных и хирургических отделениях. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):321–332.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-373>

EDN: <https://www.elibrary.ru/rmjxsl>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-373>

Antimicrobial resistance and virulence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from children in intensive care and surgical units

Irina E. Novikova^{1✉}, Zulfirya Z. Sadeeva¹, Natalya M. Alyabieva¹, Ekaterina A. Samoylova¹, Olga V. Karaseva^{1,2}, Olga G. Yanyushkina², Anna V. Lazareva¹

¹National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russia;

²Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Infections associated with carbapenem-resistant (Carba-R) *Klebsiella pneumoniae* (KP) are a serious public health problem because they lead to an increase in hospital stays, treatment costs, and an increase in patient morbidity and mortality.

Aim — to characterize antimicrobial resistance, virulence factors and genotypes of Carba-R KP strains isolated from patients in intensive care and surgical units.

Materials and methods. In total, 455 KP strains that were resistant to meropenem and/or imipenem, or susceptible to meropenem and/or imipenem at increased exposure were collected in 2018–2020. For further analysis, total 90 KP strains isolated from clinically significant sites — blood/cerebrospinal fluid/urine/lower respiratory tract/wounds/abdominal cavity of patients in intensive care and surgical units were selected. Antibiotic susceptibility was determined using the broth microdilution method. Carbapenemase genes were detected by real-time PCR. The virulence genes and K1/K2 capsular serotypes were determined by multiplex PCR. Sequence types (ST) were determined using multilocus sequence typing.

Results. Most of the selected isolates (97%) were recognized as extensively drug-resistant pathogens, three isolates were classified as multidrug-resistant pathogens. The major determinant of carbapenem resistance was *bla*_{OXA-48-like} (53%), *bla*_{NDM-group} was detected in 13% strains, a combination of *bla*_{NDM-group} and *bla*_{OXA-48-like} genes was found in 31% isolates. Two isolates harbored *bla*_{KPC-group}. Most of the isolates had the virulence genes *entB* (100%), *mrkD* (99%), and *ybtS* (78%). The *iutA* gene was found in 16% strains. Four isolates had *kfu* gene and four strains carried *rmpA* gene. The K2 capsule type was determined in 13% isolates. Four ST dominated in the studied population: ST395 (26%), ST2975 (19%), ST198 (12%) and ST307 (11%).

Conclusion. Carba-R KP isolates had a high level of resistance not only to carbapenems, but also to antibiotics of other classes. Carbapenem resistance was mainly associated with OXA-48 carbapenemase. The *entB*, *mrkD* and *ybtS* genes were the main determinants of virulence. The epidemically successful clones CG395 and CG307 were the predominant genetic lines. Resistance to antimicrobials was combined with the presence of various virulence factors. The data obtained are important for the epidemiological surveillance of the spread of KP and have important clinical implications.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance, virulence

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients and their legal representatives. The research protocol was approved by the Local Independent Ethics Committee of the National Medical Research Center of Children's Health (protocol No. 5, June 2, 2022).

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: Novikova I.E., Sadeeva Z.Z., Alyabieva N.M., Samoylova E.A., Karaseva O.V., Yanyushkina O.G., Lazareva A.V. Antimicrobial resistance and virulence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from children in intensive care and surgical units. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(4):321–332. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-373>. EDN: <https://www.elibrary.ru/rmjxsl>

Введение

Представители порядка *Enterobacterales* играют важную роль в структуре нозокомиальных инфекций. Среди них особое место занимает *Klebsiella pneumoniae* (KP), входящая в группу ESKAPE

(*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*), представители которой являются ведущей причиной внутрибольничных инфекций во всём мире [1].

КР занимает различные ниши в природе, а также колонизирует желудочно-кишечный тракт человека и животных. Зачастую КР может быть инфекционным агентом при различных тяжёлых состояниях: пневмонии, бактериемии, менингите [2].

Глобальной проблемой здравоохранения является растущая антибиотикорезистентность КР. Штаммы КР могут сочетать различные механизмы резистентности, что ведёт к появлению мультирезистентных патогенов, устойчивых практически ко всем классам антибактериальных препаратов (АМП), что значительно усложняет лечение [3]. Основными препаратами для лечения инфекций, вызванных КР, являются бета-лактамы антибиотиков. Продукция ферментов бета-лактамаз ведёт к разрушению бета-лактамового кольца, обеспечивающего антимикробную активность препарата [4]. Бета-лактамазы разделяют на четыре молекулярных класса. Сериновые бета-лактамазы относятся к классам А, С, D. Металло-бета-лактамазы (МБЛ), содержащие 1 или 2 атома цинка в активном центре, относятся к классу В [4].

В 1980-х гг. появились первые сообщения о внебольничных инфекциях у здоровых людей, вызванных гипервирулентными штаммами КР, приводящими к эндофальмиту, гнойному абсцессу печени и другим заболеваниям [5]. В настоящее время вызывает беспокойство появление гипервирулентных штаммов, резистентных к бета-лактамам антибиотикам, в том числе карбапенемам [6].

Важную роль в развитии инфекционного процесса играют факторы вирулентности КР: капсула, липополисахарид, системы утилизации ионов трёхвалентного железа и адгезивные структуры [7]. Полисахаридная капсула обеспечивает защиту бактериальной клетки от воздействия антител и факторов комплемента. Гипервирулентные штаммы ассоциированы с мукоидным фенотипом за счёт гиперпродукции капсульных полисахаридов. Гены-регуляторы мукоидного фенотипа *rmpA* и *rmpA2* ответственны за регуляцию синтеза внеклеточных полисахаридов. Наличие слизистого фенотипа также связано с геном *magA*, который располагается в кластере генов *cps* и кодирует капсульную полимеразу Wzu, ассоциированную с серотипом K1 [8]. По данным нескольких исследований, вирулентные штаммы КР, обладающие гипермукоидным фенотипом, чаще всего принадлежали к капсульным серотипам K1 и K2 [9, 10]. Во время инфекционного процесса клеткам КР, как и другим бактериальным патогенам, требуется железо.

Сидерофоры — молекулы, секретирующиеся клетками КР для получения ионов железа из организма хозяина. У КР встречаются несколько видов сидерофоров: энтеробактин, йерсиниобактин, сальмохелин и аэробактин. Наиболее часто КР продуцируют энтеробактин, он широко распространён

среди как классических, так и гипервирулентных изолятов. Экспрессию энтеробактина способен нейтрализовать липокалин-2 — белок, синтезируемый нейтрофилами и другими клетками во время инфекции. Сальмохелин — это гликозилированная форма энтеробактина, не позволяющая липокалину-2 нейтрализовать сальмохелин [7]. Йерсиниобактин, впервые обнаруженный как фактор вирулентности у бактерий рода *Yersinia*, чаще экспрессируется гипервирулентными клебсиеллами (90%), чем классическими (18%) [7]. Аэробактин наиболее распространён среди гипервирулентных изолятов (93–100%), у классических штаммов встречается редко [7]. Считается, что система утилизации трёхвалентного железа Kfu также ассоциируется с гипервирулентными КР. Штаммы, обладающие этой системой поглощения железа, главным образом, выделялись от пациентов с инвазивными инфекциями [7].

Адгезивные структуры — ещё один важный фактор патогенности КР. Фимбрии 1-го и 3-го типов обеспечивают прикрепление КР к клеткам человека и абиотическим поверхностям, участвуют в формировании биоплёнок. Фимбрии 1-го типа кодируются кластером генов *fim*, фимбрии 3-го типа кодирует кластер генов *mrkABCD* [11]. Метаболизм аллантаина помогает бактериям получать углерод и азот из окружающей среды. По данным исследования, проведённого в Тайване, ген, ассоциированный с усвоением аллантаина, присутствовал в 100% гипервирулентных КР [12].

Высокий уровень устойчивости к АМП в сочетании с повышенной вирулентностью КР способствует её длительной персистенции в организме пациента. При этом происходит диссеминация микроорганизма из локусов мониторинга (зев, анус) в клинически значимые стерильные локусы (раны, нижние дыхательные пути, кровоток, мочевыводящие пути и др.) Это неблагоприятно сказывается на течении основного заболевания, приводя к увеличению сроков пребывания в лечебном учреждении и повышению расходов на лечение, поэтому мониторинг факторов вирулентности и антибиотикорезистентности крайне важен.

Цель исследования — охарактеризовать антибиотикорезистентность, вирулентные свойства и генотипы карбапенемрезистентных (Карба-Р) штаммов КР, выделенных от пациентов, находившихся в реанимационных и хирургических отделениях.

Материалы и методы

Бактериальные культуры

В 2018–2020 гг. собраны 455 штаммов КР, не чувствительных к меропенему и/или имипенему (минимальная подавляющая концентрация (МПК) меропенема и имипенема более 8 и 4 мг/л соответственно) либо чувствительных к меропенему и/или

имипенему при увеличенной экспозиции (МПК меропенема и имипенема 2–8 и 2–4 мг/л соответственно). Штаммы были получены от пациентов, находившихся в реанимационных и хирургических отделениях НМИЦ здоровья детей и НИИ неотложной детской хирургии и травматологии.

Для дальнейшего исследования были отобраны 90 изолятов КР, выделенных из клинически значимых локусов: крови и ликвора ($n = 10$), мочи ($n = 41$), нижних дыхательных путей ($n = 22$), ран ($n = 10$), брюшной полости ($n = 7$). Отобранные изоляты КР были получены от 79 пациентов через 48 ч и более после госпитализации. Штаммы от одного пациента включали в исследование, если между датами выделения прошло не менее 1 мес.

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов и их законных представителей. Протокол исследования одобрен Локальным независимым этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра здоровья детей (протокол № 5 от 02.06.2022).

Посевы биологического материала производили на питательную среду Uri-select agar («BioRad») и инкубировали при 37°C в течение 24–48 ч. Видовую идентификацию проводили на масс-спектрометре «MALDI-ToF-MS» («Bruker Daltonics»). Рекомендуемые значения Score $\geq 2,0$ использовали в качестве критерия надёжной видовой идентификации.

Чувствительность к антибактериальным препаратам

Для определения чувствительности к АМП использовали метод микроразведений в бульоне Мюллера–Хинтона («bioMérieux»). Клинические категории чувствительности изолятов к АМП определяли на основании пограничных МПК в соответствии с рекомендациями EUCAST, версия 10.0 [13]. Определена чувствительность к 15 АМП: пиперациллину-тазобактаму, тикарциллину-клавуланату, цефтазидиму, цефепиму, азтреонаму, меропенему, имипенему, тобрамицину, амикацину, гентамицину, ципрофлоксацину, левофлоксацину, колистину, триметоприму-сульфаметоксазолу и фосфомицину.

Все изоляты были разделены на штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (multidrug-resistant, MDR) и на штаммы с широкой лекарственной устойчивостью (extensively drug-resistant, XDR) в соответствии с рекомендациями G.J. German и соавт. [14]. Классификация основана на чувствительности микроорганизмов к 6 группам АМП: аминогликозидам (тобрамицин или гентамицин), пенициллинам (пиперациллин-тазобактам), карбапенемам (имипенем или меропенем), цефалоспорином (цефотаксим, цефтриаксон или цефтазидим), фторхинолонам (ципрофлоксацин), сульфа-

зиламидам (триметоприм-сульфаметоксазол). Изоляты, не чувствительные к 3 или 4 перечисленным группам, классифицировали как MDR, штаммы, не чувствительные к 5 или 6 группам, — как XDR.

Определение генов карбапенемазы

Бактериальную ДНК выделяли из суточной культуры с помощью коммерческих наборов «ГК-экспресс» (ЦНИИ Эпидемиологии). Карбапенемазы групп IMP, NDM, VIM, KPC, OXA-48 определяли с использованием наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс MDR MBL-FL», «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии). В качестве положительного и отрицательного контролей использовали образцы, входящие в состав набора. Реакцию амплификации проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Определение факторов вирулентности и капсульных серотипов

Гены вирулентности и принадлежность к капсульным серотипам K1/K2 определяли методом мультиплексной ПЦР [15].

Изоляты были протестированы на наличие следующих генов:

- *magA*, специфичный для серотипа K1;
- *rmpA*, регулирующий синтез мукоидного фенотипа;
- *entB*, ассоциированный с синтезом энтеробактина;
- *ybtS*, связанный с синтезом йерсениобактина;
- *kfu*, ответственный за связывание железа;
- *iutA*, кодирующий транспортер азробактина;
- *mrkD*, ассоциированный с фимбриальными адгезинами 3-го типа;
- *allS*, связанный с метаболизмом аллантаина;
- *wzi*, специфичный для серотипа K2.

Ген *entB* был включён в дизайн исследования в качестве положительного контроля, т.к. широко распространён среди КР. Результаты реакции оценивали путём проведения электрофореза в 2% агарозном геле. Использованные праймеры представлены в **табл. 1**.

Мультилокусное секвенирование-типирование

Генотипирование штаммов КР проводили согласно схеме, предложенной Институтом Пастера [18], основанной на анализе аллельных профилей 7 «генов домашнего хозяйства»: *rpoB* (бета-субъединицы РНК-полимеразы), *gapA* (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы), *mdh* (малатдегидрогеназы), *pgi* (фосфоглюкоза-изомеразы), *phoE* (фосфорина E), *infB* (фактора инициации трансляции 2), *tonB* (периплазматического энергетического трансдуцера). Полученные нуклеотидные последовательности анали-

Таблица 1. Праймеры, использованные для определения генов вирулентности и серотипов K1/K2
Table 1. Primers used for identification of the virulence genes and K1/K2 serotypes

Праймер Primer	Последовательность 5'–3' Sequence 5'–3'	Размер продукта, п.о. Amplicon size, bp	Источник Source
ybtS_f	GACGGAAACAGCACGGTAAA	242	[15]
ybtS_r	GAGCATAATAAGGCGAAAGA		
mrkD_f	AAGCTATCGCTGTACTTCCGGCA	340	[15]
mrkD_r	GGCGTTGGCGCTCAGATAGG		
entB_f	GTCAACTGGGCSTTTGAGCCGTC	400	[15]
entB_r	TATGGGCGTAAACGCCGGTGAT		
rmpA_f	CATAAGAGTATTGGTTGACAG	461	[15]
rmpA_r	CTTGCATGAGCCATCTTTCA		
K2_f	CAACCATGGTGGTTCGATTAG	531	[16]
K2_r	TGGTAGCCATATCCSTTTGG		
kfu_f	GGCCTTTGTCCAGAGCTACG	638	[15]
kfu_r	GGGTCTGGCGCAGAGTATGC		
allS_f	CATTACGCACSTTTGTCAGC	764	[15]
allS_r	GAATGTGTCGGCGATCAGCTT		
iutA_f	GGGAAAGGCTTCTCTGCCAT	920	[15]
iutA_r	TTATTCGCCACCACGCTCTT		
magA_f	GGTGCTCTTTACATCATTGC	1,283	[17]
magA_r	GCAATGGCCATTTGCGTTAG		

зировали с помощью программы «SeqMan» и затем сравнивали с аллельными профилями базы данных BIGSdb¹. Сиквенс-типы (ST) идентифицировали на основании комбинации аллелей.

Результаты

Почти все отобранные штаммы ($n = 87$; 97%) продемонстрировали фенотип XDR, оставшиеся 3 изолята обладали фенотипом MDR. Все изоляты показали высокий уровень устойчивости к карбапенемам. К меропенему были нечувствительны 79 (88%) штаммов (МПК > 8 мг/л), 11 (12%) изолятов относились к категории чувствительных при повышенной экспозиции (МПК 2–8 мг/л). Резистентность к имипенему проявили 72 (80%) штамма (МПК > 4 мг/л), 16 (18%) изолятов были чувствительны к имипенему при повышенной экспозиции (МПК 2–4 мг/л), 2 (2%) штамма были чувствительны к имипенему (МПК < 2 мг/л).

Все исследованные штаммы были устойчивы к пиперациллину-тазобактаму, тикарциллину-клавуланату и тобрамицину. Высокая частота устойчивости была выявлена к цефтазидиму (98%), цефепиму (98%), азтреонаму (94%), фосфомоцину (91%), амикацину (89%), гентамицину (83%), ципрофлоксацину (87%), левофлоксацину (87%), триметоприму-сульфаметоксазолу (87%), колистин (43%) (табл. 2).

¹ URL: <https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella>

Продукция карбапенемаз обнаружена у всех исследованных изолятов КР. Главной детерминантой резистентности была карбапенемаза группы OXA-48 ($n = 48$; 53%), в 12 (13%) штаммах выявлена МБЛ группы NDM, сочетание карбапенемаз NDM и OXA-48 обнаружено у 28 (31%) изолятов. Два штамма обладали карбапенемазой группы KPC. Карбапенемаз VIM и IMP найдено не было.

При анализе факторов вирулентности выявлено, что все штаммы КР обладали геном *entB* ($n = 90$; 100%). Ген *mrkD* найден у всех исследованных штаммов ($n = 89$; 99%), за исключением 1 изолята. У большинства изолятов был обнаружен ген *ybtS* ($n = 70$; 78%). У 14 (16%) штаммов найден ген *iutA*. Четыре изолята показали наличие генов *kfu*, и у 4 штаммов был найден ген *rmpA*. Гена *allS* не было найдено ни в одном исследованном изоляте. Было обнаружено 7 комбинаций от 2 до 5 генов вирулентности. Комбинация 2 генов (*mrkD* + *entB*) и (*ybtS* + *entB*) найдена у 15 и 1 изолятов соответственно; 3 генов (*ybtS* + *mrkD* + *entB*) и (*mrkD* + *entB* + *iutA*) — у 56 и 5 штаммов соответственно; 4 генов (*ybtS* + *mrkD* + *entB* + *iutA*) и (*ybtS* + *mrkD* + *entB* + *kfu*) — у 5 и 4 изолятов соответственно; 5 генов (*ybtS* + *mrkD* + *entB* + *rmpA* + *iutA*) — у 4 изолятов. Двенадцать (13%) изолятов принадлежали к серотипу K2. Штаммов, относящихся к серотипу K1, не обнаружено (табл. 3).

Таблица 2. Устойчивость к антибиотикам изолятов *K. pneumoniae***Table 2.** Antibiotic resistance of *K. pneumoniae* isolates

Антибиотик Antibiotic	МПК, мг/л* MIC, mg/l*		Число резистентных изолятов Number of resistant isolates	
	чувствительность ≤ susceptibility ≤	резистентность > resistance >	<i>n</i>	%
Меропенем Meropenem	2	8	79	88
Имипенем Imipenem	2	4	72	80
Пиперациллин-тазобактам Piperacillin-tazobactam	8	16	90	100
Тикарциллин-клавуланат Ticarcillin-clavulanate	8	16	90	100
Цефтазидим Ceftazidime	1	4	88	98
Цефепим Cefepime	1	4	88	98
Амикацин Amikacin	8	8	80	89
Гентамицин Gentamicin	2	2	75	83
Тобрамицин Tobramycin	2	2	90	100
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	0,25	0,5	78	87
Левифлоксацин Levofloxacin	0,5	1	78	87
Триметоприм-сульфаметоксазол Trimethoprim-sulfamethoxazole	2	4	78	87
Колистин Colistin	2	2	39	43
Азтреонам Aztreonam	1	4	85	94
Фосфомицин Fosfomycin	32	32	82	91

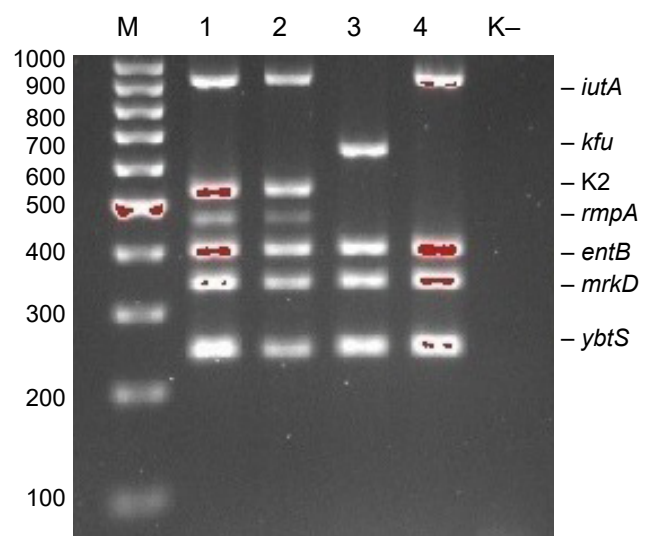
Примечание. *В соответствии с EUCAST [13].

Note. *According to EUCAST [13].

Результаты анализа амплификации генов вирулентности *K. pneumoniae* представлены на **рисунке**.

Наиболее вирулентные штаммы, сочетающие 4–5 генов вирулентности, были выделены из нижних дыхательных путей ($n = 4/22$), мочи ($n = 5/41$), ран ($3/10$), брюшной полости ($n = 1/7$). Из 28 штаммов, сочетающих 2 гена карбапенемаз, 15 (54%) приходилось на изоляты, выделенные из мочи. В штаммах из других локусов 2 гена карбапенемаз встречались у единичных изолятов: нижние дыхательные пути ($n = 3$), брюшная полость ($n = 3$), кровь ($n = 3$), рана ($n = 4$).

Большинство исследованных штаммов ($n = 33$; 37%) сочетали 1 ген резистентности к карбапенемам и 3 гена вирулентности: OXA-48 + *ybtS* + *mrkD* + *entB* ($n = 22$); OXA-48 + *mrkD* + *entB* + *iutA* ($n = 3$); NDM + *ybtS* + *mrkD* + *entB* ($n = 8$). Сочетание 2 генов резистентности и 3 генов вирулентности встречалось в 28 (31%) изолятах: OXA-48 + NDM + *ybtS* + *mrkD* + *entB* ($n = 26$); OXA-48 + NDM + *mrkD* + *entB* + *iutA* ($n = 2$). Шестнадцать (18%) штаммов обладали одним геном резистентности и 2 генами вирулентности: OXA-48 + *mrkD* + *entB* ($n = 9$); OXA-48 + *ybtS* + *entB* ($n = 1$); NDM + *mrkD* + *entB* ($n = 4$); KPC + *mrkD* + *entB* ($n = 2$). Комбинация 1 гена резистентности и 4–5 генов вирулентности встречалась у 13 (14%) штаммов: OXA-48 + *ybtS* +



Анализ ПЦР-амплификации генов вирулентности КР при помощи электрофореза в 2% агарозном геле.

М — линейка молекулярных масс; штаммы КР: 1, 2 — *ybtS*, *mrkD*, *entB*, *rmpA*, серотип K2, *iutA*; 3 — *ybtS*, *mrkD*, *entB*, *kfu*; 4 — *ybtS*, *mrkD*, *entB*, *iutA*; К- — отрицательный контроль реакции.

Analysis of PCR amplification of *K. pneumoniae* virulence genes by electrophoresis in 2% agarose gel.

M — molecular size marker; *K. pneumoniae* strains: 1, 2 — *ybtS*, *mrkD*, *entB*, *rmpA*, K2 serotype, *iutA*; 3 — *ybtS*, *mrkD*, *entB*, *kfu*; 4 — *ybtS*, *mrkD*, *entB*, *iutA*; K- — negative control.

Таблица 3. Распределение изолятов *K. pneumoniae* в зависимости от ST, носительства детерминант вирулентности и принадлежности к серотипу K2

Table 3. Distribution of *K. pneumoniae* isolates depending on the ST, carriage of virulence determinants, and belonging to K2 serotype

ST (n)	n	K2	ybtS	mrkD	entB	rmpA	kfu	iutA
ST395 (23)	7	+	+	+	+			
	6			+	+			
	4		+	+	+			
	3		+	+	+			+
	2	+	+	+	+	+		+
	1		+		+			
ST2975 (17)	17		+	+	+			
ST198 (11)	11		+	+	+			
ST307 (10)	8		+	+	+			
	1		+	+	+		+	
	1		+	+	+			+
ST377 (6)	3			+	+			+
	3			+	+			
ST29 (4)	4		+	+	+			
ST147 (4)	3		+	+	+			
	1			+	+			
ST397 (2)	2		+	+	+		+	
ST512 (2)	2			+	+			
ST584 (2)	1	+		+	+			+
	1			+	+			+
ST5829 (2)	2	+	+	+	+	+		+
ST 23(1)	1		+	+	+			+
ST42 (1)	1			+	+			
ST280 (1)	1			+	+			
ST405 (1)	1		+	+	+		+	
ST985 (1)	1		+	+	+			
ST3346 (1)	1			+	+			
Новый ST (1) New ST (1)	1		+	+	+			
Всего Total	90	12 (13%)	70 (78%)	89 (99%)	90 (100%)	4 (4%)	4 (4%)	14 (16%)

mrkD + *entB* + *iutA* ($n = 5$); OXA-48 + *ybtS* + *mrkD* + *entB* + *kfu* ($n = 4$); OXA-48 + *ybtS* + *mrkD* + *entB* + *rmpA* + *iutA* ($n = 4$).

При исследовании Карба-Р-штаммов КР методом мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) выявлены 18 различных ST, в том числе 3 изолята принадлежали к 2 новым, ранее не описанным ST. Один ST из них зарегистрирован в базе данных МЛСТ под номером ST5829 ($n = 2$), для него описан новый вариант гена *tonB*, которому присвоен номер аллеля 809. Второй ST с новым вариантом гена *phoE* ($n = 1$) — в процессе регистрации. Большая часть исследованной популяции (68%)

принадлежала к 4 ST: ST395 ($n = 23$; 26%), ST2975 ($n = 17$; 19%), ST198 ($n = 11$; 12%) и ST307 ($n = 10$; 11%). Шесть (7%) штаммов относились к ST377. По 4 изолята принадлежали к ST29 и ST147, остальные ST были представлены 1–2 штаммами (табл. 4).

Большинство штаммов ST395 ($n = 23$) ассоциировалось с карбапенемазой OXA-48 ($n = 20$). Девять из 12 штаммов серотипа K2 принадлежали к ST395. Среди ST2975 ($n = 17$) преобладали штаммы с сочетанием карбапенемаз OXA-48 и NDM ($n = 13$). Шесть штаммов ST198 сочетали карбапенемазы OXA-48 и NDM, а в 5 изолятах найдена только NDM. Все штаммы ST307 ($n = 10$) обладали един-

Таблица 4. Распределение изолятов *K. pneumoniae* в зависимости от ST и носительства детерминант резистентности, $n = 90$ **Table 4.** Distribution of *K. pneumoniae* isolates depending on ST and carriage of resistance determinants, $n = 90$

ST	n (%)	n	OXA-48	NDM	KPC
ST395	23 (26%)	20	+		
		2	+	+	
		1		+	
ST2975	17 (19%)	13	+	+	
		4	+		
ST198	11 (12%)	6	+	+	
		5		+	
ST307	10 (11%)	10	+		
ST377	6 (7%)	4	+		
		2	+	+	
ST29	4 (4%)	4	+	+	
ST147	4 (4%)	2		+	
		1	+		
		1	+	+	
ST397	2 (2%)	2	+		
ST512	2 (2%)	2			+
ST584	2 (2%)	2	+		
ST5829	2 (2%)	2	+		
ST23	1 (1%)	1	+		
ST42	1 (1%)	1		+	
ST280	1 (1%)	1		+	
ST405	1 (1%)	1	+		
ST985	1 (1%)	1		+	
ST3346	1 (1%)	1		+	
Новый ST New ST	1 (1%)	1	+		

ственной детерминантой резистентности OXA-48. Во всех изолятах ST29 ($n = 4$) найдена комбинация OXA-48 и NDM. Среди 4 изолятов ST147 2 показали наличие только NDM, 1 имел OXA-48, 1 обладал сочетанием OXA-48 + NDM. Два штамма, показавшие наличие KPC, относились к ST512. В изолятах, принадлежащих к ST397 ($n = 2$), ST584 ($n = 2$), ST5829 ($n = 2$), ST23 ($n = 1$), ST405 ($n = 1$), новому ST ($n = 1$), была найдена карбапенемаза OXA-48. В изолятах, принадлежащих к ST42 ($n = 1$), ST280 ($n = 1$), ST985 ($n = 1$) и ST3346 ($n = 1$), найдена МБЛ группы NDM.

Всего с временным интервалом было получено 20 штаммов от 9 пациентов. У 4 пациентов изоляты КР были выделены из разных локусов. Все штаммы имели фенотип XDR. Восемнадцать штаммов обладали одинаковыми детерминантами резистентности и вирулентности (за исключением 2 штаммов от 1 пациента с различием в носительстве гена *kfu*) и принадлежали к одинаковым ST. Два штамма, выделенные от 1 пациента из нижних дыхательных путей и мочи, относились к разным ST (ST395 и

ST2975) и имели различия в носительстве карбапенемазы (OXA-48 и OXA-48 + NDM). Гены вирулентности у этих изолятов были одинаковыми.

Обсуждение

Результаты нашего исследования показали высокий уровень устойчивости к АМП среди Карба-Р-штаммов КР, полученных от пациентов, находившихся в реанимационных и хирургических отделениях НМИЦ здоровья детей и НИИ неотложной детской хирургии и травматологии — стационаров, куда поступают наиболее сложные пациенты из различных регионов России, часто после предшествующих госпитализаций в других учреждениях. Практически все изоляты обладали фенотипом XDR и были нечувствительны к 5–6 группам АМП.

По данным исследования МАРАФОН 2015–2016 гг., среди нозокомиальных изолятов КР высокий уровень устойчивости был выявлен к цефалоспорином III–IV поколения (цефепиму — 87,6%; цефтазидиму — 87,3%) и азтреонаму (88,6%). Ре-

зистентность к имипенему и меропенему проявили 11,9 и 12,2% изолятов соответственно. Оценка чувствительности к аминогликозидам выявила, что резистентными к тобрамицину, гентамицину и амикацину были 81,3, 63,1, 27,1% штаммов КР соответственно. Высоким уровнем устойчивости был к защищённым пенициллинам: тикарциллин-клавуланату — 92,5%, пиперациллин-тазобактаму — 66% изолятов. Резистентность к цiproфлоксацину, триметоприму-сульфамексазолу и фосфомицину проявили 83,6, 76,5, 51,2% изолятов соответственно. Высокую активность в отношении штаммов КР показал колистин, к нему были устойчивы только 9,4% изолятов [19].

В исследовании, проведённом нашими коллегами в 2012–2017 гг., был выявлен высокий уровень резистентности нозокомиальных штаммов КР к цефалоспорином (100%), карбапенемам (93,1–98,7%), фторхинолонам (92,5%), фосфомицину (90,1%), аминогликозидам (49,7–84,3%) и колистину (44,7%) [20]. Исследование 2017–2019 гг. продемонстрировало высокие показатели устойчивости к АМП штаммов КР, выделенных от пациентов в отделении реанимации и интенсивной терапии: большинство штаммов имели фенотип XDR (87,3%). Все изоляты были резистентны к пенициллинам, цефалоспорином и фторхинолонам. Высокий уровень устойчивости был выявлен к аминогликозидам (98,4%), карбапенемам (84,1%), сульфаниламидам (82,5%). К полимиксинам были нечувствительны 28,6% изолятов [21]. Полученные нами результаты подтверждают тенденцию к повышению уровня резистентности к важнейшим группам АМП нозокомиальных штаммов КР.

Главным механизмом резистентности среди исследованных изолятов КР стало носительство карбапенемазы OXA-48. Впервые карбапенемаза OXA-48 была обнаружена у КР в Турции в 2001 г. [22] и впоследствии распространилась по всему миру [23]. Продуцирующая OXA-48-подобные карбапенемазы КР эндемична для России [19, 24]. В исследованной нами популяции преобладал ST395 — клон высокого эпидемического риска, распространяющий карбапенемазы OXA-48 и KPC в Европе и Азии [4]. В России часто встречаются штаммы ST395, продуцирующие *bla*_{OXA-48} [20, 25], что согласуется с нашими данными.

Считается, что ST307 впервые появился в 1990-х гг., за 20 лет до его первого описания, и ответственен за внутрибольничные вспышки по всему миру [26]. Анализ, проведённый K.L. Wuyes и соавт., показал, что ST307 является успешным MDR-клоном, источником генов различных карбапенемаз, а также содержит дополнительные факторы резистентности и вирулентности [26]. В исследовании, проведённом в Испании, получены данные о ST307, ассоциированном с карбапенемазой OXA-48 [27]. В работах из России были описаны

изоляты ST307, продуцирующие *bla*_{OXA-48} [20, 21], что согласуется с нашими данными.

В изученной нами выборке ST2975 однолокусный вариант ST307 был вторым по встречаемости. Первый изолят ST2975, продуцирующий *bla*_{KPC-2}, был выделен в Великобритании [28] и появился в международной базе данных МЛСТ Института Пастера в 2016 г. Мы не нашли других сообщений о ST2975 в зарубежных и отечественных исследованиях. Большая часть штаммов ST2975 нашей коллекции обладала сочетанием карбапенемаз OXA-48 и NDM. Энтеробактерии, продуцирующие NDM, были выделены по всему миру из клинических образцов, окружающей среды и от животных [29].

Впервые штаммы КР ST198, выделенные в 2014–2016 гг., были описаны в исследованиях из Бразилии [30, 31]. R. Nakamura-Silva и соавт. обнаружили в штаммах ST198 карбапенемазы OXA-1 и KPC [31]. В изолятах ST198, выделенных от белого аиста в Алжире, была найдена МБЛ NDM-5 [32]. Сообщалось о штаммах КР ST198, выделенных из образцов животных и человека в США и Норвегии [33, 34]. В изученных нами изолятах ST198 преобладала комбинация карбапенемаз OXA-48 и NDM.

Мы обнаружили карбапенемазу группы KPC в 2 изолятах генотипа ST512, который относится к CG258. В отечественных исследованиях встречались единичные изоляты КР, продуцирующие KPC [20, 35, 36], что согласуется с нашими данными.

В последние годы появляется всё больше сообщений о появлении одновременно гипервирулентных и мультирезистентных штаммов КР [37, 38], хотя ранее считалось, что эти генетические линии не пересекаются [39]. Такие штаммы являются важной проблемой здравоохранения из-за высокого риска распространения и способности вызывать тяжёлые инфекции [40]. Считается, что КР серотипов K1/K2 более вирулентны, чем КР других серотипов [7]. По данным исследования H. Pan и соавт., 4,5% продуцирующих карбапенемазы штаммов КР относились к серотипу K1, 34,8% — к K2 [41]. Мы не обнаружили штаммов с серотипом K1, а к серотипу K2 принадлежало 13% изолятов. Интересно, что 11 из 12 штаммов серотипа K2 относились к ST395 и его однолокусному варианту ST5829. Похожие данные были получены при исследовании штаммов КР, выделенных в 12 больницах России в 2003–2020 гг. Капсульный серотип K2 был обнаружен у 15,7% штаммов и ассоциировался с ST395 [35].

Основными детерминантами вирулентности в нашем исследовании были гены сидерофоров *entB* и *ybtS* и ген *mrkD*, ассоциированный с фимбриями 3-го типа. Согласно анализу, проведённому D. Hu и соавт., распространённость генов *entB* и *mrkD* у КР составила более 90% [42]. В сообщениях из Китая и Индии ген *entB* встречался у 90,5–90,9% изолятов КР, *mrkD* — у 98,5%, *ybtS* — у 44,3–89,4% [41, 43].

В исследовании R. Nan и соавт. выявлено, что гены сидерофоров *entB* и *ybtS* могут существенно увеличить вирулентность Карба-Р-штаммов КР [44]. Сидерофор аэробактин редко продуцируется классическими нозокомиальными штаммами, поскольку более характерен для гипервирулентных КР [7]. Ген транспортера аэробактина *iutA* встречался у 56,8% изолятов КР, выделенных от больных менингитом в Китае [45]. В другом исследовании ген *iutA* был выявлен у 48,5% КР, продуцирующих карбапенемазы [42]. В нашем исследовании *iutA* встречался у 16% штаммов. Гены *rmpA* и *kfu* обнаружены у единичных изолятов, что согласуется с данными других исследований, проведённых среди штаммов КР с фенотипом MDR [21, 41].

Результаты нашего исследования позволяют оценить характеристики Карба-Р-штаммов КР, полученных от пациентов педиатрических стационаров. Наряду с высокой антибиотикорезистентностью, штаммы КР имеют различные вирулентные свойства, что может быть причиной их распространения в стационарах с потенциальным увеличением тяжёлых форм бактериальных инфекций, а также негативно повлиять на успех лечения. Дальнейший мониторинг распространения факторов антибиотикорезистентности и вирулентности является важной задачей.

Заключение

В настоящей работе мы не оценивали распространённость Карба-Р КР в стационарах. Проведённое нами исследование выявило высокий уровень устойчивости Карба-Р-штаммов, выделенных в реанимационных и хирургических отделениях, не только к карбапенемам, но и к антибиотикам других классов. Устойчивость к карбапенемам главным образом была обусловлена карбапенемазой OXA-48 (53%). Преобладающими генетическими линиями были эпидемически успешные клоны CG395 (ST395 — $n = 23$, ST5829 — $n = 2$) и CG307 (ST2975 — $n = 17$, ST307 — $n = 10$). Главными детерминантами вирулентности были *entB* (100%), *mrkD* (99%) и *ybtS* (78%). Другие гены вирулентности встречались у незначительного числа изолятов, однако вызывает беспокойство сочетание антибиотикорезистентности и важных факторов вирулентности.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Santajit S., Indrawattana N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed. Res. Int.* 2016; 2016:2475067. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Ding L., Yang Z., Lu J., et al. Characterization of phenotypic and genotypic traits of *Klebsiella pneumoniae* from lung cancer patients with respiratory infection. *Infect. Drug. Resist.* 2020;13:237–45. DOI: <https://doi.org/10.2147/idr.s229085>
- Aghapour Z., Gholizadeh P., Ganbarov K., et al. Molecular mechanisms related to colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Infect. Drug. Resist.* 2019;12:965–75. DOI: <https://doi.org/10.2147/idr.s199844>
- Шамина О.В., Самойлова Е.А., Новикова И.Е., Лазарева А.В. *Klebsiella pneumoniae*: микробиологическая характеристика, антибиотикорезистентность и вирулентность. *Российский педиатрический журнал.* 2020;23(3):191–7. Shamina O.V., Samoilova E.A., Novikova I.E., Lazareva A.V. *Klebsiella pneumoniae*: microbiological characterization, antimicrobial resistance, and virulence. *The Russian Journal of Pediatrics.* 2020;23(3):191–7. DOI: <https://doi.org/10.18821/1560-9561-2020-23-3-191-197> EDN: <https://elibrary.ru/fytman>
- Liu Y., Cheng D., Lin C. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Arch. Intern. Med.* 1986;146(10):1913–6. DOI: <https://doi.org/10.1001/archinte.1986.00360220057011>
- Gu D., Dong N., Zheng Z., et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet. Infect. Dis.* 2018;18(1):37–46. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30489-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30489-9)
- Paczosa M.K., Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016;80(3):629–61. DOI: <https://doi.org/10.1128/membr.00078-15>
- Fang C.T., Lai S.Y., Yi W.C., et al. The function of *wzy_K1* (*magA*), the serotype K1 polymerase gene in *Klebsiella pneumoniae cps* gene cluster. *J. Infect. Dis.* 2010;201(8):1268–9. DOI: <https://doi.org/10.1086/652183>
- Shon A.S., Bajwa R.P., Russo T.A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence.* 2013;4(2):107–18. DOI: <https://doi.org/10.4161/viru.22718>
- Cubero M., Grau I., Tubau F., et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007–2013). *Clin. Microbiol. Infect.* 2016;22(2):154–60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.09.025>
- Clegg S., Murphy C.N. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol. Spectr.* 2016;4(1). DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0005-2012>
- Yu W.L., Ko W.C., Cheng K.C., et al. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008;62(1):1–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.007>
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Ver. 10.0; 2020. URL: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints
- German G.J., Gilmour M., Tipples G., et al. Canadian recommendations for laboratory interpretation of multiple or extensive drug resistance in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. Commun. Dis. Rep.* 2018;44(1):29–34. DOI: <https://doi.org/10.14745/ccdr.v44i01a07>
- Compain F., Babosan A., Brisse S., et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 2014;52(12):4377–80. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.02316-14>
- Yu W.L., Fung C.P., Ko W.C., et al. Polymerase chain reaction analysis for detecting capsule serotypes K1 and K2 of *Klebsiella pneumoniae* causing abscesses of the liver and other sites. *J. Infect. Dis.* 2007;195(8):1235–6. DOI: <https://doi.org/10.1086/512686>
- Fang C.T., Chuang Y.P., Shun C.T., et al. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and

- septic metastatic complications. *J. Exp. Med.* 2004;199(5):697–705. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20030857>
18. Diancourt L., Passet V., Verhoef J., et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(8):4178–82. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.4178-4182.2005>
19. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacterales* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРЭФОН 2015–2016. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2019;21(2):147–59. Sukhorukova M.V., Eidel'shtein M.V., Ivanchik N.V., et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Enterobacterales* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «Marathon 2015-2016». *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2019;21(2):147–59. DOI: <https://doi.org/10.36488/cmasc.2019.2.147-159> EDN: <https://elibrary.ru/qdarvm>
20. Shamina O.V., Kryzhanovskaya O.A., Lazareva A.V., et al. Emergence of a ST307 clone carrying a novel insertion element MITEKpn1 in the mgrB gene among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Moscow, Russia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020;55(2):105850. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.11.007>
21. Fursova N.K., Astashkin E.I., Gabrielyan N.I., et al. Emergence of five genetic lines ST395^{NDM-1}, ST13^{OXA-48}, ST3346^{OXA-48}, ST39^{CTX-M-14}, and novel ST3551^{OXA-48} of multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* in Russia. *Microb. Drug. Resist.* 2020;26(8):924–33. DOI: <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0289>
22. Poirel L., Héritier C., Tolün V., Nordmann P. Emergence of oxacillinase mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(1):15–22. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.48.1.15-22.2004>
23. Potron A., Poirel L., Rondinaud E., Nordmann P. Intercontinental spread of OXA48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill.* 2013;18(31):20549. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.31.20549>
24. Новикова И.Е., Садеева З.З., Шакирзянова Р.А. и др. Использование полимеразной цепной реакции для детекции генов резистентности у грамотрицательных бактерий в рутинной практике педиатрического стационара. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2022;67(3):180–5. Novikova I.E., Sadeeva Z.Z., Shakirzyanova R.A., et al. The using of the polymerase chain reaction for the detection of resistance genes in gram-negative bacteria in routine practice in a pediatric hospital. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2022;67(3):180–5. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-180-185> EDN: <https://elibrary.ru/akcthf>
25. Шайдуллина Э.Р., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных карбапенемазопродуцирующих штаммов *Enterobacterales* в России: результаты эпидемиологического исследования 2014–2016 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2018;20(4):362–9. Shaidullina E.R., Eidel'shtein M.V., Skleenova E.Yu., et al. Antimicrobial resistance of nosocomial carbapenemase-producing *Enterobacterales* in Russia: results of surveillance, 2014–2016. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2018;20(4):362–9. DOI: <https://doi.org/10.36488/cmasc.2018.4.362-369> EDN: <https://elibrary.ru/zaghhn>
26. Wyres K.L., Hawkey J., Hetland M.A.K., et al. Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *J. Antimicrob. Chemother.* 2019;74(3):577–81. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dky492>
27. Cañada-García J.E., Moure Z., Sola-Campoy P.J., et al. CARB-ES-19 multicenter study of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from all Spanish provinces reveals interregional spread of high-risk clones such as ST307/OXA-48 and ST512/KPC-3. *Front. Microbiol.* 2022;13:918362. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.918362>
28. Villa L., Feudi C., Fortini D., et al. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microb. Genom.* 2017;3(4):e000110. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000110>
29. Khan A.U., Maryam L., Zarrilli R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):101. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1012-8>
30. Lopes R., Cerdeira L.T., Fernandes M.R., et al. Draft genome sequence of a CTX-M-15-producing endophytic *Klebsiella pneumoniae* ST198 isolate from commercial lettuce. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2017;10:19–20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.03.005>
31. Nakamura-Silva R., Cerdeira L., Oliveira-Silva M., et al. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a retrospective study in Manaus, Brazil. *Arch. Microbiol.* 2022;204(4):202. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02813-0>
32. Loucif L., Chelaghma W., Cherak Z., et al. Detection of NDM-5 and MCR-1 antibiotic resistance encoding genes in *Enterobacterales* in long-distance migratory bird species *Ciconia ciconia*, Algeria. *Sci. Total. Environ.* 2022;814:152861. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152861>
33. Holt K.E., Wertheim H., Zadoks R.N., et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2015;112(27):E3574–81. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>
34. Raffelsberger N., Hetland M.A.K., Svendsen K., et al. Gastrointestinal carriage of *Klebsiella pneumoniae* in a general adult population: a cross-sectional study of risk factors and bacterial genomic diversity. *Gut Microbes.* 2021;13(1):1939599. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1939599>
35. Khrulnova S., Fedorova A., Frolova I., et al. Distribution of virulence genes and capsule types in *Klebsiella pneumoniae* among bloodstream isolates from patients with hematological malignancies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2022;104(1):115744. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2022.115744>
36. Лазарева И.В., Агеевец В.А., Ершова Т.А. и др. Распространение и антибактериальная резистентность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, в Санкт-Петербурге и некоторых других регионах Российской Федерации. *Антибиотики и химиотерапия.* 2016;61(11–12):28–38. Lazareva I.V., Ageevets V.A., Ershova T.A., et al. The spread and antibacterial resistance of gram-negative bacteria, carbapenemase producers, in St. Petersburg and some other regions of the Russian Federation. *Antibiotics and Chemotherapy.* 2016;61(11–12):28–38. EDN: <https://elibrary.ru/yjtpzr>
37. Karlsson M., Stanton R.A., Ansari U., et al. Identification of a carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolate in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019;63(7):e00519–19. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00519-19>
38. Yonekawa S., Mizuno T., Nakano R., et al. Molecular and epidemiological characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Japan. *mSphere.* 2020;5(5):e00490–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/msphere.00490-20>
39. Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F., et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg. Infect. Dis.* 2014;20(11):1812–20. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2011.140206>

40. Lan P., Jiang Y., Zhou J., Yu Y. A global perspective on the convergence of hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2021;25:26–34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.02.020>
41. Pan H., Lou Y., Zeng L., et al. Infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: microbiological characteristics and risk factors. *Microb. Drug Resist.* 2019; 25(2):287–96. DOI: <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0339>
42. Hu D., Li Y., Ren P., et al. Molecular epidemiology of hypervirulent carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021;11:661218. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.661218>
43. Remya P.A., Shanthi M., Sekar U. Characterisation of virulence genes associated with pathogenicity in *Klebsiella pneumoniae*. *Indian J. Med. Microbiol.* 2019;37(2):210–8. DOI: https://doi.org/10.4103/ijmm.ijmm_19_157
44. Han R., Niu M., Liu S., et al. The effect of siderophore virulence genes entB and ybtS on the virulence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microb. Pathog.* 2022;171:105746. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105746>
45. Xu M., Fu Y., Fang Y., et al. High prevalence of KPC-2-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* causing meningitis in Eastern China. *Infect. Drug Resist.* 2019;12:641–53. DOI: <https://doi.org/10.2147/idr.s191892>

Информация об авторах

Новикова Ирина Евгеньевна[✉] — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НМИЦ здоровья детей, Москва, Россия, novikovayudina@outlook.com, <https://orcid.org/0000-0003-4234-0209>

Садеева Зульфурья Закиевна — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НМИЦ здоровья детей, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4587-0902>

Алябьева Наталья Михайловна — к.м.н., с.н.с., зав. лаб. экспериментальной иммунологии и вирусологии НМИЦ здоровья детей, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9365-9143>

Самойлова Екатерина Александровна — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НМИЦ здоровья детей, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5993-8285>

Карасева Ольга Витальевна — д.м.н., зам. директора по научной работе, рук. отдела сочетанной травмы, анестезиологии-реанимации НИИ неотложной детской хирургии и травматологии; зав. отделом неотложной хирургии и травм детского возраста НМИЦ здоровья детей, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9418-4418>

Янюшкина Ольга Грантовна — н.с. отделения сочетанной травмы НИИ неотложной детской хирургии и травматологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6227-466X>

Лазарева Анна Валерьевна — д.м.н., г.н.с. лаб. молекулярной микробиологии, зав. лаб. микробиологии НМИЦ здоровья детей, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3896-2590>

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 21.06.2023;
принята к публикации 30.07.2023;
опубликована 28.08.2023

Information about the authors

Irina E. Novikova[✉] — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia, novikovayudina@outlook.com, <https://orcid.org/0000-0003-4234-0209>

Zulfirya Z. Sadeeva — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4587-0902>

Natalya M. Alyabyeva — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Head, Laboratory of experimental immunology and virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9365-9143>

Ekaterina A. Samoylova — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5993-8285>

Olga V. Karaseva — D. Sci. (Med.), Deputy director for scientific work, Head, Department of combined trauma, anesthesiology and resuscitation, Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma; Head, Department of Emergency Surgery and Pediatric Trauma, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9418-4418>

Olga G. Yanyushkina — researcher, Department of combined trauma, Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6227-466X>

Anna V. Lazareva — D. Sci. (Med.), chief researcher, Laboratory of molecular microbiology, Head, Laboratory of microbiology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3896-2590>

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 21.06.2023;
accepted for publication 30.07.2023;
published 28.08.2023

REVIEWS

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-410>



A modern view of diarrheagenic *Escherichia coli* — a causative agent of acute intestinal infections

Maria A. Makarova[✉]

¹Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

Abstract

Acute intestinal infections caused by *Escherichia coli* affect the gastrointestinal tract, leading to development of diarrheal syndrome, intoxication, and, in some cases, generalization of the pathological process. Diarrheagenic *E. coli* (DEC) strains differ from non-pathogenic (commensal) strains by the presence of specific virulence genes, pathogenesis characteristics, clinical and epidemiological manifestations of the diseases they cause. Based on the virulence determinants, 6 pathogenic DEC groups are distinguished: enteropathogenic, enterotoxigenic, enteroinvasive, shiga toxin-producing, enteroaggregative, diffusely adherent *E. coli* strains. The strains of each pathogenic group have distinct pathogenic mechanisms responsible for inflammatory processes in different compartments of the human intestine, which are clinically manifested as diarrheal syndrome. This paper presents a review of current scientific publications on epidemiology, pathogenesis, genetic properties, and antigenic characteristics of pathogenic *E. coli*. Although DEC biological properties have been extensively studied, many aspects require deeper insights to develop effective laboratory-based diagnostic techniques, treatment methods, epidemic control measures, and prevention strategies against *E. coli* infections.

Keywords: review, diarrhea, acute intestinal infections, *E. coli* infections, diarrheagenic *Escherichia coli*, pathogenicity

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: Makarova M.A. A modern view of diarrheagenic *Escherichia coli* — a causative agent of acute intestinal infections. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(4):333–344.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-410>. EDN: <https://www.elibrary.ru/rnmhnb>

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-410>

Современное представление о диареогенных *Escherichia coli* — возбудителях острых кишечных инфекций

Макарова М.А.[✉]

¹Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

²Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Острые кишечные инфекции, обусловленные *Escherichia coli*, характеризуются поражением желудочно-кишечного тракта с развитием диарейного синдрома, интоксикации и в некоторых случаях генерализации патологического процесса. Диареогенные *E. coli* (DEC) отличаются от непатогенных (комменсальных)

штаммов наличием определённых генов вирулентности, особенностями патогенеза и клинико-эпидемиологическими проявлениями вызываемых ими заболеваний. В соответствии с детерминантами вирулентности выделяют 6 патогенных групп DEC: энтеропатогенные, энтеротоксигенные, энтероинвазивные, шигатоксин-продуцирующие, энтероагрегативные, диффузно-адгезивные. Штаммы каждой группы характеризуются конкретными патогенетическими механизмами, обеспечивающими развитие воспалительного процесса в разных отделах кишечника человека, клинически проявляющегося диарейным синдромом. В статье представлен обзор современной научной литературы по эпидемиологии, патогенезу, генетическим свойствам и антигенной характеристике патогенных *E. coli*. Несмотря на многолетнее и разностороннее изучение биологических свойств DEC, многие аспекты биологии этого вида требуют более углублённого анализа знаний, необходимых для разработки эффективных методов лабораторной диагностики, лечения, проведения противоэпидемических мероприятий и профилактики эшерихиозов.

Ключевые слова: обзор, диарея, острые кишечные инфекции, эшерихиозы, диареегенные *Escherichia coli*, патогенность

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: Макарова М.А. Современное представление о диареегенных *Escherichia coli* — возбудителях острых кишечных инфекций. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4): 333–344. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-410>. EDN: <https://www.elibrary.ru/rnmhnb>

Introduction

According to the World Health Organization (WHO)¹ and the United Nations Children's Fund², there are about 2 billion cases of diarrheal disease worldwide every year, combining about 20 diseases of bacterial, viral, protozoal, or helminthic etiology; diarrheal diseases are the second (following pneumonia) leading cause of incidence and death in children younger than 5 years of age, mostly in developing countries (countries of Africa and Southeast Asia account for 78%). Approximately 1.9 million children die from diarrheal diseases each year, accounting for 18% of all deaths among children; over 5,000 children die daily from diarrheal diseases³. The studies conducted in Russia demonstrated a high proportion of infectious diseases in the overall incidence structure (36–49%) and the absence of any downward trend⁴. According to the World Bank's estimates, among 4 leading causes of global burden of diseases and injuries, three (diarrheal diseases, intestinal helminth infections, and tuberculo-

sis) are infectious and parasitic diseases. Every year, in Russia, there are 35–40 million cases of infectious and parasitic diseases. In industrialized countries, diarrhea develops in 0.5–2.0 episodes per person a year. In the United States, more than 100 million cases of diarrhea are reported annually, accounting for nearly 25% of all hospitalizations. Affecting working-age population and children, diarrheal diseases have a significant social and economic impact [1–3]. In the past decades, despite advancements in medical and social technology, the global burden of infectious diarrhea has not decreased; on the contrary, it has increased due to high intensity tourism and migration of large groups of the population. Children under 5 years of age, adults over 60 of age, immunocompromised individuals, including individuals taking corticosteroids, receiving chemotherapy and radiation therapy, having organ or stem cell transplants, systemic diseases, living with acquired immunodeficiency syndrome, and alcohol abusers are at the highest risk of severe and life-threatening diarrhea. In 2013, WHO launched the integrated Global Action Plan for the Prevention and Control of Diarrhea. It is expected that its successful implementation will reduce diarrhea-related death rates to below 1.0 per 1,000 persons by 2025 [2].

Acute intestinal infections (AII) caused by diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) affect the gastrointestinal tract, leading to development of diarrheal syndrome, intoxication and, in some cases, generalization of the pathological process (sepsis, meningitis, pyelonephritis, cholecystitis). DEC differ from non-pathogenic *E. coli* by the presence of specific virulence genes, pathogenesis characteristics, clinical and epidemiological symptoms of the diseases caused by them

¹ World Health Organization. Diarrhoeal disease. Key facts. Facts sheets, 2017.

URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets>

² The United Nations Children's Fund/World Health Organization. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. 2009. URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44174/9789241598415_eng.pdf?sequ

³ World Health Organization. Ending preventable child deaths from pneumonia and diarrhoea by 2025. The integrated Global Action Plan for Pneumonia and Diarrhoea (GAPPD). 2013. URL: https://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/global_action_plan_pneumonia_diarrhoea/en/

⁴ Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. On Sanitary and Epidemiological Wellbeing of the Population in the Russian Federation in 2019: National Report. Moscow; 2020. 299 p.

[3–5]. Based on the virulence determinants, DEC are classified into pathogenic groups (pathogroups). The specific nature of these determinants is manifested in the ability of each pathogroup to cause a disease with distinctive pathological syndromes. Currently, there are 6 commonly recognized DEC pathogroups:

- enteropathogenic *E. coli* (EPEC);
- enterotoxigenic *E. coli* (ETEC);
- enteroinvasive *E. coli* (EIEC);
- Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC);
- enteroaggregative *E. coli* (EAEC);
- diffusely adherent *E. coli* (DAEC) [6–8].

In the opinion of some researchers, the assignment of DAEC to a separate pathogroup requires additional experimental evidence [9]. Strains of each DEC pathogroup have specific pathogenetic mechanisms involved in the development of inflammatory processes in different compartments of the human intestine, which are clinically manifested as diarrheal syndrome.

The active exchange of genetic information contributes to the natural occurrence of strains having sets of virulence genes that are specific for different pathotypes and pathogroups [7, 10]. A good example is *E. coli* O104:H4, which caused a major AII outbreak in Germany in 2011 and belongs to the "hybrid" group – enteroaggregative Shiga toxin-producing *E. coli* [11]. After the outbreak, multiple scientific publications have reported that this phenomenon is more common than previously thought. Therefore, the terms "hybrid" and "heterogeneous" *E. coli* are used to describe new combinations of virulence factors among classical *E. coli* pathotypes and DEC pathogroups [12–16].

Enteropathogenic *E. coli*

EPEC causes diseases in young children, mainly affecting the small intestine (coli infection, colienteritis). EPEC adhere tightly to the plasma membrane of epithelial cells and colonize the small intestine, destroying microvilli of enterocytes and the apical surface of epithelial cells. The loss of absorbent villi within the EPEC adhesion area leads to diarrhea due to electrolyte imbalance and malabsorption. EPEC differ from other DEC pathogroups by the presence of a pathogenicity island (the locus of enterocyte effacement), which encodes several important virulence factors, including the outer membrane protein – intimin (encoded by the *eae* gene), which is essential for the key mechanism of EPEC pathogenicity – "attachment and effacement" of enterocytes, as well as the EPEC adherence factor plasmid (pEAF) that encodes bundle-forming pili (Bfp), which promote bacterial adherence to intestinal epithelial cells. Depending on the presence or absence of pEAF, EPEC are classified into typical (tEPEC) and atypical (aEPEC). aEPEC do not have pEAF and, therefore, do not produce Bfp [6, 17].

In 1987, WHO recognized that EPEC comprised strains of 12 O serogroups (O26, O55, O86, O111,

O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, and O158) [18]. Over the past 20 years, the list of EPEC serovars has increased significantly; currently, strains of 22 O serogroups and 60 serovars are associated with this pathogroup. **Table 1** presents classical and new O:H EPEC serovars.

Since the 1990s, due to the advances in the understanding of molecular aspects of the EPEC pathogenesis, researchers have been able to move beyond the serological groups, which do not always correlate with the disease, and to work out the definition based on pathogenicity. The Second International Symposium on EPEC adopted the following definition of the above DEC pathogroup: "EPEC are DEC that produce the characteristic A/E histopathology and do not produce Shiga-like toxins. tEPEC have a virulence plasmid known as the EAF (EPEC adherence factor) plasmid, which encodes Bfp pili mediating localized adherence to intestinal epithelial cells, while aEPEC do not have this plasmid. Most of the tEPEC strains belong to specific O:H serovars" [18–20].

Table 1. Serological variants of EPEC

O-antigen	H-antigen	Comments
O18	H7	
O20	H26; H34	
O25	H1	
O26	H ⁻ ; H11	O26: H ⁻ and O26:H11 may also be STEC
O44	H34	
O55	H ⁻ ; H6; H7	O55:H7, H10 and H ⁻ may also be STEC
O75	H ⁻	
O86	H ⁻ ; H8 [*] ; H27; H34	O86: H ⁻ may also be EAgeEC
O88	H ⁻ ; H25	
O91	H7; H ⁻	
O103	H2 [*]	
O111	H ⁻ ; H2; H7; H12	O111: H ⁻ may also be STEC
O114	H ⁻ ; H2; H10; H32	
O119	H ⁻ ; H2; H6	
O125	H ⁻ ; H6; H21	O125 may also be EAgeEC
O126	H ⁻ ; H2; H21; H27	
O127	H ⁻ ; H6; H9; H21; H40	
O128	H ⁻ ; H2; H7; H8; H12	O128:H2 may also be STEC
O142	H ⁻ ; H6; H34	
O145	H ⁻ [*] ; H 45 [*]	
O157 [*]	H8 [*] ; H10; H16 [*] ; H45	
O158	H ⁻ ; H23	

Note. *New serovar EPEC.

Epidemiological studies of tEPEC and aEPEC strains have demonstrated that tEPEC remains the leading cause of severe childhood diarrhea in developing countries. At the same time, aEPEC causes AII not only in children, but also in adults in industrialized countries. tEPEC strains are assigned to causative agents of anthroponotic infection, when a human is the only source of infection, and the contact transmission is the most frequent route of transmission in children's hospitals and healthcare facilities. aEPEC causes diarrheal diseases in children and adults; it is a causative agent of zoonotic infections, in which animals (frequently cattle) act as reservoirs of pathogens, which are mainly transmitted through animal origin foods. aEPEC strains pose a zoonotic risk to humans and support the concept that animals are a source of aEPEC infection in humans [6, 21, 22].

Enterotoxigenic *E. coli*

EPEC remains a leading cause of sporadic and cholera-like group diarrhea in children in tropical and subtropical developing countries; it is responsible for up to 40% of AIIs among bottle-fed infants. In economically developed countries, EPEC causes "traveler's diarrhea" in tourists visiting regions where EPEC infection is endemic. Among EPEC, there are strains that cause diarrhea in humans and domestic animals of various species. The key role here is played by unique colonization factors and receptors within the intestinal epithelium, i.e. EPEC that are pathogenic to animals cannot colonize the human small intestine [23].

The major aspects of EPEC pathogenicity are adhesion leading to colonization of enterocytes and production of enterotoxins causing electrolyte imbalance in intestinal epithelial cells, leading to profuse diarrhea. EPEC adhere to epithelial cells of the human small intestine and colonize them using fimbrial factors of the CFA group (colonization factor antigens) encoded by *cfa* genes, which can be located on chromosomes and on plasmids [8, 24]. Enterotoxins known as heat-labile (LT) and heat-stable (ST) differ in their properties and mechanisms of action. Both toxins are produced by approximately 5% of the EPEC population, while LT is produced by 25% and ST by 70% of EPEC [6]. By its structural and antigenic characteristics as well as by its mechanism of action, LT resembles a cholera toxin. It inactivates the regulatory protein that controls the activity of adenylate cyclase of the basolateral membrane of enterocytes, thus causing an increase in intracellular levels of cyclic adenosine monophosphate, stimulation of chloride secretion and inhibition of NaCl absorption resulting in profuse secretory diarrhea. There are two known variants of LT: LT1, which is produced by strains isolated from humans, and LT2 – the enterotoxin having similar structure and biological characteristics but produced by *E. coli* strains of animal origin. LT1 is encoded by the *eltI* gene located on plasmids; LT2

is encoded by the *eltII* gene located in chromosomes [7, 8, 24]. ST affects enterocytes, causing disruption of iron transport, electrolyte loss, reduction in sodium absorption, and, eventually, massive water release into the intestinal lumen. Two ST groups have been identified: STa (ST1) and STb (ST2). STa are further classified into STp ("porcine" ST, ST1a) and STh ("human" ST, ST1b) toxins having similar structures and mechanisms of action. The cellular guanylyl cyclase functions as a receptor for STa; its activation increases cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels in enterocytes, leading to electrolyte loss and inhibition of NaCl absorption, thus causing massive secretion of fluid into the intestinal lumen. STb belongs to the group of membrane-damaging toxins. Currently, the receptor for STb has not been identified; unlike STa, STb does not increase cGMP levels, but it stimulates bicarbonate, prostaglandin E2, and serotonin secretion by enterocytes. STa and STb toxins are encoded by *estA* and *estB* genes located on plasmids. CFA-encoding genes are adjacent to enterotoxin-encoding genes; the simultaneous expression of *cfa* and *tox* genes provides EPEC virulence. Enterotoxins are pathogenetically inactive without colonization factors in the same way as CFA adhesins without toxins [23].

EPEC are associated with a limited number of O groups and O:K:H serovars. **Table 2** presents the known and most common EPEC serovars causing AII in humans [6].

Enteroinvasive *E. coli*

EIEC infection is common in low-income countries and is very similar in its clinical presentation to bacillary dysentery [6, 23, 25]. The pathogenesis of EIEC infection is characterized by the ability of bacteria to invade the human colonic mucosa; their invasion is mediated by the expression of chromosomal and plasmid-borne genes. Following the penetration into colonic epithelial cells, EIEC replicate intracellularly and spread to adjacent cells, causing the inflammatory destruction of the intestinal epithelial barrier, thus provoking typical dysentery syndrome characterized by the presence of blood, mucus, and leukocytes in stools [8].

The taxonomic relatedness of EIEC and *Shigella* spp. and the similarity of their pathogenesis, virulence factors and genes present similar clinical manifestations of the disease. The infectious dose of EIEC is much higher than that of *Shigella*, and in some cases, the diseases caused by EIEC are milder [25, 26]. The main gene conferring the pathogenic phenotype of *Shigella* spp. and EIEC is the invasion plasmid antigen H coding gene (*ipaH*) located in the chromosome within a large F-type plasmid (pINV), which is responsible for pathogen replication and spread inside and outside epithelial cells and within the intestinal lumen. The pINV plasmid has been found only in *Shigella* spp. and EI-

EC; its loss is a very rare event, which determines an avirulent phenotype of the strain. Other virulence genes located on extrachromosomal plasmids play an auxiliary role in the interaction of the pathogen with the epithelium and can be unevenly distributed in *Shigella* spp. and EIEC strains; they encode proteins affecting the induction (*ial*) and transcriptional regulation (*invE*) of invasion genes. Tests limited to detection of genes located on extrachromosomal plasmids can produce false negative results, as strains may often lose these plasmids [8]. The biochemical characteristics were first described in 1967. Like *Shigella*, most EIEC strains are unable to decarboxylate lysine, lack the ability to ferment lactose, and are generally non-motile [6, 25, 27]. Being taxonomically related (the same genospecies), EIEC and *Shigella* spp. share several phenotypic and genotypic characteristics, making the differentiation between them challenging, especially in the presence of O-antigenic bonds (cross-reactions). This problem often leads to misinterpretation of the epidemiological information, causing difficulty with estimation of the actual burden of EIEC infections.

A limited number of serovars have been assigned to the EIEC pathogroup, namely O28ac:H⁻, O29:H⁻, O112ac:H⁻, O115:H⁻, O121:H⁻, O124:H⁻, O124:H7, O124:H30, O124:H32, O135:H⁻, O136:H⁻, O143:H⁻, O144:H⁻, O144:H25, O152:H⁻, O159:H⁻, O159:H2, O164:H⁻, O167:H⁻, O167:H4, O167:H5, O173:H⁻, and recently O96:H19. Some of these EIEC-associated O antigens, such as O28, O112ac, O121, O124, O143, O144, O152, and O167, are identical to O antigens present in *Shigella* spp. [25, 27, 28].

EIEC-infected humans represent the principal source of infection. Although AIIIs caused by EIEC occur worldwide, they are particularly common in low-income countries where poor hygienic and sanitary conditions contribute to their spread [6, 29]. In some Latin American and Asian countries (Chile, Brazil, Thailand, and India), EIEC are a common cause of AII [25]. In industrialized countries, outbreaks of EIEC are rare; EIEC infections are mostly reported as sporadic cases and are often travel-related, being associated with travelers returning from high-incidence countries. EIEC outbreaks were reported in Hungary (1959), the United States (1970), Czechoslovakia (1982), and Israel (1990). Recently, an increase in cases of EIEC infections has been observed in Europe. In 2012, an outbreak of colitis involving more than 100 individuals and caused by the new EIEC serovar O96:H19 was reported in Italy. In 2014, EIEC of this serovar were responsible for two outbreaks of *E. coli* infection in the United Kingdom [26, 29].

Shiga toxin-producing *E. coli*

STEC are common in all countries, being a major cause of foodborne diseases; they are characterized by a wide spectrum of clinical manifestations – from mild

Table 2. Serological variants of ETEC

O-antigen	(K):H-antigen
O6	H ⁻ ; K15:H16
O7	H ⁻ ; H18
O8	K47:NM, K25:H9; K40:H9; H10; K87:H19
O9	H ⁻ ; K9, K84:H2
O11	H27
O15	H11; H15; H45
O17	K23:H45; H18
O20	H ⁻ ; H30
O21	H21
O25	H ⁻ ; K7:H42; H16
O27	H7; H20; H27
O29	H?
O48	H26
O56	H ⁻
O63	H12; H30
O64	H ⁻
O65	H12
O71	H36
O73	H45
O77	H45
O78	H ⁻ ; K2:H1; H12
O85	H7
O86	H2
O88	H25
O105	H?
O114	H ⁻ ; H21
O115	H ⁻ ; H2; H40; H51
O119	H6
O126	H ⁻ ; H9; H12
O128	H7; H12; H19; H21
O133	H16
O138	K81
O139	H28
O141	H ⁻ ; H4
O147	H ⁻
O148	H28
O149	H4; H10; H19
O153	H10
O159	H ⁻ ; H2; H4; H5; H12; H20; H21; H34; H37
O166	H27
O167	H5
O?	H2; H10; H28; K39:H32

Note. H? — unknown H-antigen; O? — unknown O-antigen.

watery diarrhea to hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS) presenting a triad of symptoms: hemolytic anemia, thrombocytopenia, and acute renal failure. Small and large cattle, pigs, and more rarely other animals represent a natural reservoir of STEC. Active transmission factors include raw or undercooked meat products, raw milk, and secondarily contaminated foods. An infected person can be the potential source of infection, posing a risk to others [21, 30, 31].

The ability to produce one or more Shiga toxin (Stx) family cytotoxins constitutes the main virulence factor of STEC strains; toxin-encoding genes are located in the genome of the Stx-converting temperate bacteriophage. Stxs are classified into two types, Stx1 and Stx2. Stx1 is structurally and antigenically identical to the toxin produced by *S. dysenteriae* I (90% homology), while Stx2 has less than 60% homology. *E. coli* strains can produce either Stx1 or Stx2 and/or both toxins at the same time. Strains possessing Stx2 are more virulent than strains harboring Stx1 [7, 8]. It has been found that infections caused by Stx2-producing strains progress to HUS 6.8 times as frequent as infections caused by strains producing Stx1 or both Stx1 and Stx2 [30].

STEC having additional virulence factors (intimin and enterohemolysin) associated with severe infection in humans are known as enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). Compared to STEC, the pathogenic hallmark of EHEC is their tight adherence to intestinal epithelial cells, similar to the EPEC pattern, the key role in which belongs to the outer membrane protein – intimin encoded by the *eae* gene located in the pathogenicity island known as a locus of enterocyte effacement [8, 30].

E. coli serovar O157:H7 was first recognized as a pathogen during outbreaks of hemorrhagic colitis and HUS in the early 1980s. It is still an important STEC serovar associated with numerous outbreaks and sporadic cases of hemorrhagic colitis and HUS worldwide [32–36]. More than 100 STEC serovars are associated with human infections (Table 3).

Multiple international epidemiological studies have shown that the most common *E. coli* serovars responsible for human diseases include O26:H11, O45:H2, O103:H2, O111:H8, O121:H19, O145:H28, which are known as "The Big Six Non-O157 STEC" [32, 35].

The average incidence of HUS caused by STEC is estimated to be 2.1 cases per 100,000, while among children under 5 years of age it is 6.1 cases per 100,000. According to the European Centre for Disease Prevention and Control, HUS caused by O157:H7 *E. coli* develops in up to 7% of cases of sporadic diseases and in 20% of cases during outbreaks⁵. Prospective studies

conducted in the United States showed that STEC infections in children under 5 years of age progressed to HUS in 12.9% of cases, among 5 to 10-year-old children — in 6.8% of cases, and among children over

Table 3. Serological variants of STEC

O-antigen	H-antigen	O-antigen	H-antigen
O1	H ⁻ ; H20	O98	H ⁻ ; H25
O2	H ⁻ ; H5; H7; H29; H39	O101	H19
O4	H ⁻ ; H10	O103	H ⁻ ; H2
O5	H ⁻ ; H16	O111	H ⁻ ; H2; H8; H11; H30; H34
O6	H1; H3; H34	O112ab	H2
O7	H4	O113	H ⁻ ; H2; H4; H7; H21
O8	H19	O114	H48
O15	H ⁻ ; H27	O115	H8; H10; H18
O18	H ⁻ ; H7; H11	O116	H ⁻ ; H21
O22	H8; H16	O117	H4
O25	H ⁻	O118	H ⁻ ; H12; H16; H30
O26	H ⁻ ; H11; H32	O121	H ⁻ ; H7; H19
O38	H21	O125	H ⁻ ; H8
O39	H4	O126	H ⁻ ; H8; H27
O40	H8	O128	H ⁻ ; H2; H8; H12; H25; H35
O43	H2	O132	H ⁻
O45	H2	O136	H12; H16
O46	H31; H38	O139	H19
O48	H21	O145	H ⁻ ; H8; H16; H25
O49	H ⁻	O146	H8; H21
O50	H ⁻ ; H7	O153	H ⁻ ; H21; H25
O55	H7; H10	O156	H ⁻ ; H7; H25
O65	H16	O157	H ⁻ ; H7
O69	H11	O163	H2; H19
O74	H?	O165	H ⁻ ; H19; H25
O76	H19; H25	O171	H2
O80	H ⁻	O172	H ⁻
O82	H8	OX3	H21
O84	H ⁻ ; H2	O?	H2; H4; H7; H8; H10; H12; H16; H19; H21; H25; H32
O91	H ⁻ ; H10; H14; H21	OR	H ⁻ ; H2; H25

Note. O? — unknown O-antigen.

⁵ European Centre for Disease Prevention and Control. Shiga toxin/verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (STEC/VTEC) infection. Annual epidemiological Report for 2018. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/shiga-toxin-verocytotoxin-escherichia-coli-annual-epidemiological-report2018.pdf>

10 years of age—in 8% of cases⁶. In 2015, the non-O157 and O157 STEC infection incidence rates were 1.65 and 0.95 cases per 100,000. In 2018, the European Union/European Economic Area reported a significant increase in STEC-associated AII cases, which ranked third among zoonotic infections, being surpassed only by campylobacteriosis and salmonellosis [21].

Enteroaggregative *E. coli*

EAEC is a "new" pathogroup of DEC causing AII among children and adults in all countries; the highest incidence rates are reported among children under 5 years of age [6, 14, 37–40]. The meta-analysis of epidemiological research literature showed a statistically significant association of EAEC with acute, persistent, and chronic diarrhea, with diarrhea in HIV-infected patients and traveler's diarrhea. The symptoms of infections caused by EAEC include watery diarrhea often accompanied by pathological impurities such as mucus and blood, tenesmus, nausea, vomiting, low-grade fever. Depending on the immune status and genetic susceptibility, some patients may develop persistent diarrhea lasting more than 14 days. Genetic susceptibility associated with EAEC diarrhea was first identified in North American travelers to Mexico. Single nucleotide polymorphisms detected in IL-8 gene promoters and promoter regions of the genes encoding lactoferrin, CD14, and osteoprotegerin were recognized as indicators of susceptibility to chronic diarrhea caused by EAEC [6, 14, 41–43].

Studies conducted in Latin America, Asia, Africa, and former socialist countries of Eastern Europe have shown that EAEC is the most common bacterial cause of diarrhea in children [44]. The results obtained in the United States, Europe, and Israel also demonstrate that EAEC is a frequent cause of diarrheal diseases in children [6, 45]. In the United States, incidence rates of *E. coli* infections caused by EAEC in young children surpass those of campylobacteriosis and salmonellosis [14, 39]. Researchers agree that EAEC are the leading bacterial pathogens among hospitalized children with acute diarrhea both in less developed and in industrialized countries [40]. There is evidence that AIIs caused by EAEC are more common among adult population in industrialized countries compared to developing countries. In the United States, EAEC was the most common

cause of diarrhea in emergency and outpatient clinics among adult patients [46]. In Japan, the AII outbreaks caused by EAEC involved older children (> 5 years) and adults. In Africa, cases of EAEC diarrhea were observed among adult population of Mali, Nigeria, and Ghana [47]. Large-scale epidemiological studies conducted in many countries have shown that the diarrhea incidence is approximately 3.2 episodes per child, and up to 20% of them were associated with persistent diarrhea (> 14 days). After EAEC was recognized as the cause of chronic persistent diarrhea in Indian children, its etiological role in chronic diarrhea in children in many other countries, including Europe and America, has become unquestionable [14, 43]. Currently available data on the epidemiology of EAEC infection are inconsistent due to a large variation in pathogen detection methods, patients' age and socioeconomic status. In developing countries, EAEC is the main cause of persistent diarrhea among children with decreased physical and mental development associated with malnutrition [14, 39, 40]. In recent years, sporadic cases of EAEC diarrhea among children and adults in economically developed countries as well as group cases of infections and foodborne outbreaks in Europe, Japan, Mexico, and India have been frequently reported [6, 12, 40, 43]. In Germany, since 1997, EAEC has been the third most frequently isolated bacterial pathogen in young children with diarrhea (2%), after *Salmonella* spp. (13.4%) and STEC (3.1%). Asymptomatic carriage of EAEC is frequently detected in individuals with low socioeconomic status in developing countries. The persistence of EAEC may induce chronic intestinal inflammation, even in the absence of diarrhea, reducing the absorptive function of the intestine and leading to alimentary dystrophy and growth retardation. Considering the high number of asymptomatic EAEC-carrying children, this pathogroup of DEC has a significant impact on public health as a cause of impaired physical and cognitive development [14]. According to WHO, an estimated 32% of children under 5 years of age, who live in impoverished areas, are stunted. Unfortunately, growth deficits that occur in early life are not fully reversible and these permanent deficits are a marker of a steady loss of human potential. Stunting has been observed not only in children from poor developing countries, but also in those living in impoverished slums in middle-income countries [6, 14, 40, 43, 44, 46].

Despite ample evidence that EAEC are common DEC in Russia, they are less extensively studied and are less known compared to EPEC, EIEC, and ETEC.

Today, it is generally recognized that EAEC infections are anthroponotic, and the human is a reservoir and source of infection, though research is not over [14]. There is no evidence that animals can represent a reservoir and source of EAEC [39].

EAEC was first described in 1987 by J. Kaper et al. in the study examining patterns of adherence of

⁶ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidance for Public Health laboratories on the isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from clinical specimens. 2012. 62 p. URL: https://www.aphl.org/AboutAPHL/publications/Documents/FS_2012April_Guidance-for-PHLs-Isolation-and-Characterization-of-Shiga-Toxin-Producing-Escherichia-coli-STEC-from-Clinical.pdf; World Health Organization, Food Agriculture Organization of the United Nation. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring: report. 2018. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272871>

E. coli strains, which were collected from Chilean children with diarrhea, to Hep-2 cells in culture [7]. The strains demonstrated a distinctive "stacked-brick" pattern of aggregative adherence to epithelial Hep-2 cells. The in vitro detection of aggregative adherence remains the gold standard in detection of EAEC; however, such tests require special equipment and are time-consuming. Moreover, EAEC can be found in strains of other DEC pathogroups, such as aEPEC [7, 46].

Therefore, following the present-day definition, EAEC are diarrheagenic *E. coli* that are characterized by aggregative adherence to Hep-2 cells and do not have main genetic markers associated with other DEC pathogroups (EPEC, ETEC, EHEC, EIEC). EAEC differ from other classical DEC pathogroups by wide variability of antigenic properties and genetic markers of virulence [6, 12, 14]. At the same time, none of the described virulence factors was unambiguously associated with the virulence of EAEC, and the genes encoding them lack uniform representation in all isolated strains [39]. Results of in vitro, in vivo, and ex vivo tests convincingly demonstrate that EAEC can adhere to jejunal, ileal, and colonic epithelium, forming a strong biofilm, followed by cytotoxic and proinflammatory effects.

The pathogenesis of the disease includes three stages:

- abundant adherence to the intestinal mucosa;
- production of cytotoxins and enterotoxins;
- induction of mucosal inflammation [41, 47].

For the first stage, the presence of fimbrial and afimbrial adhesins is essential. Several colonization factors have been identified in EAEC strains. Adherence is characterized by increased secretion of mucus, which leads to the formation of a strong biofilm where EAEC are embedded. At the next stage, EAEC produce a cytotoxic effect on the intestinal mucosa due to the secretion of toxins, causing microvillus vesiculation and extrusion of epithelial cells. EAEC-induced inflammation results from abundant colonization of the intestinal mucosa [39]. The most extensively studied EAEC adhesins are aggregative adherence fimbriae (AAF), which mediate cell aggregation and biofilm formation [8, 46]. Depending on the cytotoxic or enterotoxic effect, in vitro EAEC can produce various toxins that are encoded by one chromosomal locus. *Shigella* enterotoxin 1 (ShET1) is a toxin that is present in *Shigella flexneri 2a* strains; it causes accumulation of fluid in ileal loops and promotes development of secretory diarrhea typical of infections caused by EAEC and *Shigella*. Enterotoxigenic *E. coli* heat-stable toxin 1 (EAST-1) is a 38-amino acid homolog of the ETEC STa toxin; it activates adenylate cyclase, causing elevated cGMP levels and promoting development of watery diarrhea. The gene encoding EAST1 (astA) is found in approximately 40% of EAEC and among strains of other pathogroups: 100% of STEC O157:H7, 41% of ETEC, 22% of EPEC and in 38% of *E. coli* strains

isolated from patients without AII symptoms [14, 41]. EAST1 can be found in commensal *E. coli* strains. Two proteins, Pet and Pic, are serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATE). Pet is a cytotoxin that modifies the cytoskeleton of enterocytes, leading to cell rounding and detachment; Pic is a multitask protein that mediates hemagglutination, mucus cleavage and hypersecretion, intestinal colonization, cleavage of surface glycoproteins. SPATEs are immunogenic proteins, as evidenced by the presence of antibodies against Pet and Pic in sera of children recovering from diarrhea caused by EAEC. EAEC-secreted anti-aggregation protein – dispersin that is encoded by the aap gene binds to lipopolysaccharide, neutralizing the negative charge of the bacterial surface, leading to AAF projection and, consequently, to dispersion along the intestinal mucosa. Dispersin can be present in strains of other DEC pathogroups and commensal *E. coli* [46].

Recently, it was suggested that EAEC should be divided into subgroups: typical (tEAEC) and atypical (aEAEC). This classification is based on the presence or absence of the aggR gene that encodes a transcriptional activator of the expression of both chromosomal and plasmid-encoded virulence factors, including AAF and dispersin [39, 46]. It was assumed that tEAEC strains have higher pathogenic potential [40, 48]. Several researchers reported outbreaks of diarrhea caused by aEAEC [6, 14]. Atypical EAEC are commonly isolated from children with AII; in some cases, they are detected more frequently than tEAEC [39].

Multiplex PCR tests designed for detection of multiple genes (aggR, aaf, aap, aatA, pic, pet, and astA) encoding adhesins, cytotoxins, enterotoxins, and secreted proteins were used for detection of EAEC strains [40, 47]. Although several protein components such as dispersin, Pic, ShET1, EAST-1, and Pet are involved in the virulence of EAEC, none of them is present in all strains; therefore, it was suggested that triplex PCR should be used for detection of 3 genes (aggR, aatA, and aaiA), as it provides simplified and fast detection of EAEC, including tEAEC and aEAEC [14]. As suggested by some researchers, the combination of virulence genes may depend on a geographical region [40, 48]; therefore, international microbiological surveillance of EAEC could lead to the achievement of a proper diagnostic algorithm [39].

The large number of R-type strains among EAEC presents a challenge for serotyping, resulting in multiple non-typable strains [14, 40, 48]. Nevertheless, currently, strains of 11 serological groups (and serovariants) of EAEC have been identified: O3:H2; O7:H-; O15:H18; O44:H18; O51:H11; O77:H18; O86:H-; O86:H2; O111:H21; O126:H27; O127:H2; O144:H49; ONT:H21; ONT:H33; however, the list for the DEOC pathogroup is not final.

In recent years, EAEC has been reported as a causative agent of extraintestinal infections: urinary tract

infections (cystitis, pyelonephritis) and biliary tract infections (cholangitis, cholecystitis). EAEC virulence markers have been detected in UPEC strains isolated from urine [16, 49]. The presence of UPEC markers was also detected in collections of EAEC strains [50]. These findings have demonstrated that some EAEC strains can cause urinary tract infections. Recently, EAEC has been reported as a causative agent of urosepsis and meningitis [13].

Diffusely adherent (attaching) *E. coli*

The DAEC pathogroup includes diverse strains producing numerous fimbrial and afimbrial adhesins, which mediate specific diffuse adherence to HeLa or Hep-2 epithelial cells [8, 9]. Some researchers believe that the role of DAEC in AEI requires additional epidemiological studies due to the difficulties associated with its classification and identification [51].

DAEC is detected not only in humans, but also in animals (cattle, poultry, and pigs). Clinical symptoms of the disease include diarrheal syndrome, abdominal pain, dehydration, and fever. There are no "unique" clinical symptoms specific for AII caused by DAEC. In economically developed countries, in children with diarrhea, the DAEC prevalence is lower than the prevalence of other DEC pathogroups. In developing countries, the DAEC prevalence accounts for up to 18% of the overall prevalence of DEC [51].

For a long time, the pathogenicity and epidemiological significance of DAEC have been the subject of debate, and are still controversial. Some researchers associate DAEC strains with diarrhea in children and adults, while others argue that DAEC can be present in the human intestine in all age groups without clinical symptoms of AII. Acute diarrhea caused by DAEC presents a relatively new problem of public health significance [8, 9].

Adhesins of the Afa/Dr family, which are responsible for the diffuse adherence phenotype, are the main virulence factors in the DAEC pathogenesis. It has been found that the *daaC* gene, which recognizes a conserved region of Afa/Dr operons, was more frequently detected in strains isolated from patients with diarrhea than in the control group of healthy individuals [51]. However, in some studies, DAEC strains expressing Afa/Dr were isolated with equal frequency from patients with

diarrhea and from healthy individuals of the control group, thus leading to the assumption that additional virulence factors may be involved in the pathogenesis: adhesins identical to UPEC adhesins, such as AfaE-I, AfaE-II, AfaE-III, AfaE-V, and F1845 associated with diarrheal DAEC strains; secreted autotransporter toxin belonging to the SPATE family [9, 48]. A wide variety of genes encoding adhesins makes it difficult to identify infections caused by DAEC, thus contributing to the exclusion of these pathogens from the routine diagnosis of gastrointestinal and urinary tract infections.

Conclusion

The study of AII pathogens is one of the top-priority areas in medical microbiology. *E. coli* has been long associated with diarrheal syndrome, being also considered a representative of the intestinal microbiota. The invention of PCR and high-throughput next-generation sequencing has changed the ideas about the role of *E. coli* as a causative agent of diarrheal diseases and as a resident of the intestinal microbiota; the scientific interest in this bacterium has not only increased, but also has extended into new avenues of research. While the studies laying the foundation for differentiation of *E. coli* and associated diseases were based on the phenotypic method of serotyping by O and H antigens, today, the priority attention is given to molecular and genetic characteristics of specific *E. coli* strain, to pathogenicity and resistance genes, to sequence types, etc.

To a large extent, the interest in *E. coli* can be explained by a high proportion of incidence of *E. coli* infections in the overall structure of infectious diseases. Preventive measures and proper treatment measures play a significant role in control of multiple infections; yet diseases caused by DEC remain widespread and often extremely severe. The factors contributing to this situation are associated not only with the evolution of the *E. coli* genome – emergence of new and/or virulent hybrids, but also with the intensive and prolonged use of antimicrobial agents in clinical practice, leading to emergence of highly pathogenic multidrug-resistant bacterial clones — "superbugs".

The intraspecific genetic diversity of the *E. coli* population underlies the importance of revising the assessment criteria used for the pathogenic potential of microbial strains.

REFERENCES

- Antipov M.O., Mindlina A.Ya. Epidemiological characteristics of most relevant digestive system diseases of infectious nature in the regions of Russia. *The Russian Journal of Preventive Medicine and Public Health*. 2020;23(3):76–80. DOI: <https://doi.org/10.17116/profmed20202303176> EDN: <https://elibrary.ru/lwbvds>
- Shane A.L., Mody R.K., Crump J.A., et al. 2017 infectious diseases society of America clinical practice guidelines for the diagnosis and management of infectious diarrhea. *Clin. Infect. Dis*. 2017;65(12):e45–80. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix669>
- Kovalev O.B., Novokshonov A.A., Rossina A.L., et al. Characteristics of acute intestinal infections in children hospitalized in the clinic in Moscow. *Children Infections*. 2017;16(3):59–63. DOI: <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2017-16-3-59-63> EDN: <https://elibrary.ru/zgrwlr>
- Libenko V.N., Katarbaev A.K., Mustafina K.K., Golovenko M.V. Clinical and epidemiological features of escherichiosis among children today. *Bulletin of the Kazakh National Medical University*. 2016;(1):159–63. EDN: <https://elibrary.ru/ykolhn>
- Bok E., Mazurek J., Myc A., et al. Comparison of commensal *Escherichia coli* isolates from adults and young children in Lubuskie Province, Poland: virulence potential, phylogeny and antimicrobial resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2018;15(4):617. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph15040617>
- Gomes T.A.T., Elias W.P., Scaletsky I.C.A., et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz. J. Microbiol*. 2016;47(Suppl. 1):3–30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol*. 2004;2(2):123–40. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Geurtsen J., de Been M., Weerdenburg E., et al. Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev*. 2022;46(6):fuac031. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac031>
- Chellapandi K., Ralte L., De Mandal S., et al. Diffusely adherent *E. coli* burden in low socio-economic pediatric population. *J. Med. Bacteriol*. 2019;8(5-6):44–55.
- Kartsev N.N., Svetoch E.A., Ershova M.G., et al. The characteristic of diarrheagenic *Escherichia* separated from children aged under 5 years old in Yaroslavl. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2018;63(4):249–53. DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-63-4-249-253> EDN: <https://www.elibrary.ru/yxjguo>
- Santos A.C.M., Santos F.F., Silva R.M., et al. Diversity of hybrid- and hetero-pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2020;10:339. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00339>
- Chattaway M.A., Jenkins C., Rajendram D., et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* have evolved independently as distinct complexes within the *E. coli* population with varying ability to cause disease. *PLoS One*. 2014;9(11):e112967. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112967>
- Herzog K., Dusel J.E., Hugentobler M. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. *Infection*. 2014;42(2):441–4. DOI: <https://doi.org/10.1007/s15010-013-0569-x>
- Hebbelstrup Jensen B., Olsen K.E., Struve C., et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev*. 2014;27(3):614–30. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00112-13>
- Lee J.G., Han D.S., Jo S.V., et al. Characteristics and pathogenic role of adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease: Potential impact on clinical outcomes. *PLoS One*. 2019;14(4):0216165. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216165>
- Nunes K.O., Santos A.C.P., Bando S.Y., et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* with uropathogenic characteristics are present in feces of diarrheic and healthy children. *Pathog. Dis*. 2017;75(8). DOI: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx106>
- Pakbin B., Brück W.M., Rossen J.W.A. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: a review. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(18):9922. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>
- Kaper J. Defining EPEC. In: Proceedings of the International Symposium on Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Rev. Microbiol*. 1996;27:130–3.
- Carlino M.J., Kralicek S.E., Santiago S.A., et al. Quantitative analysis and virulence phenotypes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) acquired from diarrheal stool samples from a Midwest US hospital. *Gut Microbes*. 2020;12(1):1–21. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1824562>
- Mare A.D., Ciurea C.N., Man A., et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* — a summary of the literature. *Gastroenterol. Insights*. 2021;12(1):28–40. DOI: <https://doi.org/10.3390/gastroent12010004>
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J*. 2016;14(12):e04634. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>
- Xu Y., Bai X., Wang H., et al. High prevalence of virulence genes in specific genotypes of atypical enteropathogenic *Escherichia*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2017;7:109. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00109>
- Hoseinzadeh T., Ghanbarpour R., Rokhbakhsh-Zamin F. Phylogenetic background of enterotoxigenic and enteroinvasive *Escherichia coli* from patients with diarrhea in Sirjan, Iran. *J. Microbiol*. 2016;8(3):187–92.
- Fleckenstein J.M., Kuhlmann F.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. *Curr. Infect. Dis. Rep*. 2019;21(3):9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11908-019-0665-x>
- Pasqua M., Michelacci V., Di Martino M.L., et al. The intriguing evolutionary journey of enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward pathogenicity. *Front. Microbiol*. 2017;8:2390. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02390>
- Michelacci V., Tozzoli R., Arancia S., et al. Tracing back the evolutionary route of enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and *Shigella* through the example of the highly pathogenic O96:H19 EIEC clone. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2020;10:260. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00260>
- Hendriks A.C.A., Reubsact F.A.G., Kooistra-Smid A.M.D. Genom-wide association studies of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* isolates demonstrate an absence of genetic markers for prediction of disease severity. *BMS Genomics*. 2020;21(1):138. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6555-7>
- DeRoy C., Fratamico P.M., Yan X., et al. Correction: comparison of O-antigen gene clusters of all O-serogroups of *Escherichia coli* and proposal for adopting a new nomenclature for O-typing. *PLoS One*. 2016;11(4):e0154551. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154551>
- Newitt S., MacGregor V., Robbins V., et al. Two linked enteroinvasive *Escherichia coli* outbreaks, Nottingham, UK, June 2014. *Emerg. Infect. Dis*. 2016;22(7):1178–84. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2207.152080>
- Emirova Kh.M., Tolstova E.M., Kagan M.Yu., et al. Hemolytic uremic syndrome associated with Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Nephrology (Saint-Petersburg)*. 2016;20(2):18–32. EDN: <https://www.elibrary.ru/vpuytz>

ОБЗОРЫ

31. Koutsoumanis K., Alltnde A., Alvarez-Ordóñez A., et al. Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA J.* 2020;18(1):e05967. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5967>
32. Tack D.M., Ray L., Griffin P.M., et al. Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food — foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. Sites, 2016–2019. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2020;69(17):509–14. DOI: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6917a1>
33. Joseph A., Cointe A., Kurkdjian P.M., et al. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: a narrative review. *Toxins (Basel)*. 2020;12(2):67. DOI: <https://doi.org/10.2290/toxins12020067>
34. Bai X., Ylinen E., Zhang J., et al. Comparative genomic of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from pediatric patients with and without hemolytic uremic syndrome from 2000 to 2016 in Finland. *Microbiol. Spectr.* 2022;10(4):e0066022. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00660-22>
35. Koutsoumanis K., Alltnde A., Alvarez-Ordóñez A., et al. Whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food-born microorganisms. *EFSA J.* 2019;17(12):e05898. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5898>
36. Valilis E., Ramsey A., Sidiq S., DuPont H.L. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* — a poorly appreciated enteric pathogen: Systematic review. *Int. J. Infect. Dis.* 2018;76:82–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.09.002>
37. Makarova M.A., Kaftyreva L.A. Genetic diversity of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2020;65(11):707–11. DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-707-711> EDN: <https://elibrary.ru/oiaqafu>
38. Sokolova E.D., Galtaeva A.M., Zamurii O.Yu., et al. Acute enteric infections polymerase chain reaction assay in pediatric practice: opportunities and challenges. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2016;6(3):225–31. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2016-3-225-231> EDN: <https://elibrary.ru/wwyllt>
39. Jenkins C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018;416:27–50. DOI: https://doi.org/10.1007/82_2018_105
40. Boisen N., Østerlund M.T., Joensen K.G., et al. Redefining enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): genomic characterization of epidemiological EAEC strains. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020;14(9):e0008613. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008613>
41. Ellis S.J., Crossman L.C., McGrath C.J., et al. Identification and characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* subtypes associated with human disease. *Sci. Rep.* 2020;10(1):7475. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64424-3>
42. Pabalan N., Jarjanazi H., Steiner T.S. Meta-analysis in microbiology. *Indian J. Med. Microbiol.* 2014;32(3):229–35. DOI: <https://doi.org/10.4103/0255-0857.136547>
43. Estrada-Garcia T., Perez-Martinez I., Bernal-Reynaga R., Zaidi M.B. Enteroaggregative *Escherichia coli*: a pathogen bridging the North and South. *Curr. Trop. Med. Rep.* 2014;1(2):88–96. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40475-014-0018-7>
44. Zhou S.X., Wang L.P., Liu M.Y., et al. Characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* among patients with acute diarrhea in China, 2009–2018. *J. Infect.* 2021;83(4):424–32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.08.001>
45. Hebbelstrup Jensen B., Adler Sørensen C., Hebbelstrup Rye Rasmussen S., et al. Characterization of diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* in Danish adults-antibiotic treatment does not reduce duration of diarrhea. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018;8:306. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00306>
46. Elias W.P., Navarro-Garcia F. Enteroaggregative *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli in the Americas. Chapter 2.* Springer;2016:27–57. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-45092-6_2
47. Llorente M.T., Escudero R., Ramiro R., et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* as etiological agent of endemic diarrhea in Spain: a prospective multicenter prevalence study with molecular characterization of isolates. *Front. Microbiol.* 2023;14:1120285. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1120285>
48. Ferro T.A.F., Moraes F.C., Da Silva A.M., et al. Characterization of virulence factors in enteroaggregative and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea. *Adv. Infect. Dis.* 2012;2(4):135–42. DOI: <https://doi.org/10.4236/aid.2012.24022>
49. Adwan G., Adwan K., Bourince H. Molecular characterization of some *E. coli* strains theoretically responsible for both intestinal and extraintestinal infections. *Int. J. Med. Res. Health Sci.* 2016;5(6):158–63.
50. Tanabe R.H.S., Dias R.C.B., Orsi H., et al. Characterization of uropathogenic *Escherichia coli* reveals hybrid isolates of uropathogenic and diarrheagenic (UPEC/DEC) *E. coli*. *Microorganisms.* 2022;10(3):645. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030645>
51. Abbasi P., Kargar M., Doosti A., et al. Molecular detection of diffusely adherent *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in Shiraz, Iran. *Arch. Pediatr. Infect. Dis.* 2017;5(2):e37629. DOI: <https://doi.org/10.5812/pedinfect.37629>

Информация об авторе

Макарова Мария Александровна[✉] — д.м.н., в.н.с. лаб. кишечных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры медицинской микробиологии СЗГМУ имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, makmaria@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

Статья поступила в редакцию 26.06.2023;
принята к публикации 08.08.2023;
опубликована 28.08.2023

Information about the author

Mariia A. Makarova[✉] — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of enteric infection, Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia; assistant professor, Department of medical microbiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, makmaria@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

The article was submitted 26.06.2023;
accepted for publication 08.08.2023;
published 28.08.2023



Type 4 secretion system in *Clostridioides difficile*: Structural features and its role as a pathogenicity factor

Julya V. Sorokina[✉], Yury F. Belyi

Gamaleya Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract

Clostridioides difficile is a gram-positive microorganism causing damage to the human intestinal wall, clinically manifesting as antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. *C. difficile* infection remains a serious problem; the increasing frequency of nosocomial outbreaks and the emergence of community-acquired forms heighten the need for new prevention and treatment methods. The pathogenesis of *C. difficile* infection is associated with the toxins produced by bacteria and a large group of proteins promoting the replication of the pathogen in host tissues and its spread in the human population. Recent studies show that mobile genetic elements play a key role in the high virulence of *C. difficile*. Type 4 secretion systems (T4SS) are significant components of these elements; their impressive diversity among gram-positive microorganisms in general and in *C. difficile*, in particular, implies their high evolutionary and, consequently, medical significance. Further studies of the T4SS composition and structure will provide a deeper insight into mechanisms underlying the development of respective infections and will help outline pathogenically grounded approaches to prevention and treatment of diseases caused by *C. difficile*. On the other hand, the key components of the secretion machinery of the pathogen can be used in bioinformatic analysis and for searching new adaptive clusters in the genome of highly virulent strains.

Keywords: type 4 secretion system, pathogenicity factors, *Clostridioides difficile*, conjugative transposons, antibiotic-resistant strains

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: Sorokina Ju.V., Belyi Yu.F. Type 4 secretion system in *Clostridioides difficile*: Structural features and its role as a pathogenicity factor. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(4):345–353.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-386>
EDN: <https://www.elibrary.ru/rpsjli>

Научный обзор
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-386>

Система секреции 4-го типа у *Clostridioides difficile*: структурные особенности и её роль как фактора патогенности

Сорокина Ю.В.[✉], Белый Ю.Ф.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Аннотация

Clostridioides difficile — грамположительный микроорганизм, вызывающий поражения стенки кишечника человека, которые проявляются клинически в виде антибиотикоассоциированной диареи и псевдомембранозного колита. Проблема инфекции *C. difficile* не теряет актуальности, а с распространением внутрибольничных вспышек и появлением внебольничных форм растёт потребность в новых видах её профилактики и лечения. Патогенез инфекции *C. difficile* связан с продукцией бактериями токсинов и большой группы иных белков, благоприятствующих размножению патогена в тканях макроорганизмов и его распространению в популяции людей. Исходя из исследований последних лет можно заключить, что высокой вирулентности *C. difficile* способствуют мобильные генетические элементы. Важнейшими компонентами этих элементов являются системы секреции 4-го типа (СС4Т), впечатляющее разнообразие которых среди грамположительных микроорганизмов вообще и *C. difficile* в частности говорит об их высокой эволюционной и, следовательно, медицинской значимости. Дальнейшее изучение состава и строения СС4Т позво-

лит расширить понимание механизмов развития соответствующих инфекций и наметить патогенетически обоснованные подходы к профилактике и лечению заболеваний, вызываемых *C. difficile*. С другой стороны, ключевые компоненты секреторного аппарата патогена могут быть использованы для биоинформационного анализа и поиска новых адаптивных кластеров в геноме высоковирулентных штаммов.

Ключевые слова: система секреции 4-го типа, факторы патогенности, *Clostridioides difficile*, конъюгативные транспозоны, антибиотикоустойчивые штаммы

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: Сорокина Ю.В., Белый Ю.Ф. Система секреции 4-го типа у *Clostridioides difficile*: структурные особенности и её роль как фактора патогенности. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):345–353.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-386>

EDN: <https://www.elibrary.ru/rpsjli>

Introduction

Clostridioides difficile is a gram-positive, motile, spore-forming microorganism causing intestinal lesions in humans – antibiotic-associated diarrhea and colitis of varying severity [1–3]. The pathogenicity of *C. difficile* is mediated by the ability of the pathogen to produce at least one of the two glucosylating toxins – TcdA and TcdB [4, 5] – as well as the binary toxin (CDT), though the role of the latter is still not clearly understood [6–8]. The severity of the disease, the risk of developing complications and the transition into chronic forms, as well as the emergence of new endemic strains are often associated with additional factors responsible for adhesive functions [9], spore formation [10], biofilm formation [11], cell wall modification [12, 13], and transcription [14–16]. In addition, quorum-sensing proteins play an important role in the pathogenesis of *C. difficile* infection [17, 18], regulating, among other things, toxin production levels [19], while a large group of antibiotic resistance genes facilitates the unhindered development of infection during the antimicrobial treatment [20–23].

Nucleotide sequences presumably encoding components of the type 4 secretion system (T4SS) have been found in the genomes of *C. difficile* strains relatively recently [24]. This secretion machinery plays a key role in the pathogenesis of infections caused by gram-negative bacteria *Agrobacterium tumefaciens* [25], *Legionella pneumophila* [26], *Helicobacter pylori*, and others [27]. Meanwhile, the T4SS association with the pathogenesis of diseases caused by gram-positive pathogens has only recently gained attention of microbiologists [28–31]. It has become increasingly clear that exploration of the structure and function of this secretion machinery is important not only for deciphering infectious processes, but also for developing treatment and prevention tools [28, 30]. In our review, we tried to provide insights into distinctive features of the *C. difficile* T4SS class C organization to outline avenues and prospects of its further research.

Type 4 secretion system in gram-positive and gram-negative microorganisms

T4SS is a multicomponent transmembrane protein structure, which participates in the delivery of toxic effectors to the target cell [25], in the horizontal transfer of mobile genetic elements (MGEs) between microorganisms [23] and in the DNA exchange with the environment [27]. By their structure, the type 4 secretion systems are divided into three classes: A, B, and C (T4SS-A, T4SS-B, T4SS-C, respectively) [32, 33]. The latter is found only in gram-positive bacteria and is an integral part of the conjugative DNA transfer elements: plasmids, integrative and conjugative elements, and pathogenicity islands [33–35].

T4SS-A of the gram-negative phytopathogen *A. tumefaciens* is a prototype for the type 4 secretion machinery (Fig. 1, a). It is known as VirB/VirD4 and is composed of 12 subunits [25]. It consists of cytoplasmic ATPases (VirD4, VirB4, VirB11), which provide energy for the translocation process and are the first to bind to effector molecules [36], inner (VirB3, VirB6, VirB8) and outer (VirB7, VirB9, VirB10) membrane components forming the transmembrane channel [24], as well as structural pilus proteins (VirB1, VirB2, VirB5) [37]. This secretion machinery successfully transports tumor-inducing Ti-plasmid fragments into eukaryotic plant cells [25] and a number of auxiliary proteins [38, 39]. In plants, both groups of molecules promote the development of tumor-like growths (galls) where the further proliferation of bacterial cells takes place [25]. T4SS-A is associated not only with the virulence of phytopathogens [40], but also with the virulence of human pathogens. For example, in *Helicobacter pylori*, T4SS-A effector molecules induce a pro-inflammatory response in gastric epithelial cells [41] and cause uncontrolled division of host cells [42].

Unlike *A. tumefaciens* T4SS-A, class B secretion systems deliver primarily protein effectors to eukaryotic target cells [43] and play a critical role in the patho-

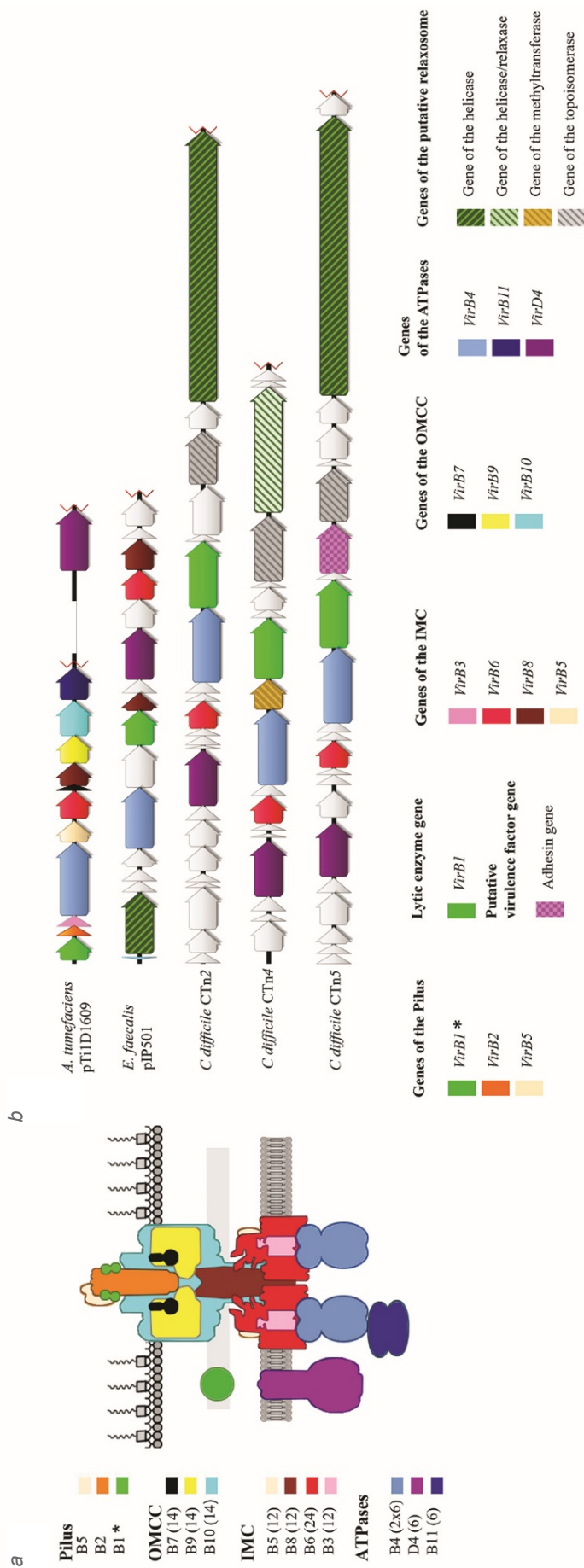


Fig. 1. T4SS organization.

a — schematic representation of the *Agrobacterium tumefaciens* type 4A secretion machinery [25]; *b* — T4SS-C components of three conjugative transposons of *C. difficile* strain 630 compared to representatives of T4SS-A (*A. tumefaciens* pTiD1609) and T4SS-C (*Enterococcus faecalis* pIP501). The visualization was performed using the Genious software; the data on each component were verified using NCBI and UniProt databases, as well as using separate pairwise alignments. IMC — the inner membrane complex; OMCC — the outer membrane core complex. *In T4SS-A, *VirB1*, being a lytic enzyme, breaks bonds within the peptidoglycan during the formation of a transmembrane channel; it also forms a part of the pilus assembly.

genesis of such diseases as Legionnaires' disease [26] and Q fever [44, 45]. Among T4SSs-B in gram-negative bacteria, the most extensively studied secretion machinery is Dot/Icm in *Legionella pneumophila* – an intracellular pathogen and the causative agent of legionellosis. It participates in the transport of more than 300 effector molecules, most of which have not been described yet. Effector molecules are involved in formation of special replicative phagosomes in eukaryotic cells [46] and interfere with vital activities of the host cell [47, 48], promoting intracellular proliferation of *Legionella* [49].

Conjugative T4SSs-C in gram-positive microorganisms are similar in structure to the above systems and include homologs of the respective subunits [33]. For example, the *Enterococcus* sp. plasmid pIP501 (Fig. 1, b) contains:

- TraA relaxase (required for formation of a single-stranded DNA fragment);
- TraG hydrolase (a *VirB1* homolog), which cleaves bonds in peptidoglycan during the formation of the secretion machinery;
- proteins forming a channel through the cell wall – TraL (a *VirB6* homolog), TraM, and TraH (the last two are putative *VirB8* homologs);
- TraE and TraJ ATPases (*VirB4* and *VirD4* homologs, respectively) [50–52].

As the outer membrane is absent in gram-positive microorganisms, the T4SS-C secretion machinery can be represented by the so-called "minimized" structures comprising only 4–7 subunits [34, 35] compared to 12 subunits in *A. tumefaciens* [25] or 27 in *L. pneumophila* [53].

While in gram-negative bacteria T4SS is strongly associated with the pathogenesis of infections, in gram-positive bacteria this type of secretion machinery is primarily seen as a participant in conjugative processes and, consequently, as a factor in the dissemination of antibiotic resistance genes (*Clostridium perfringens* plasmids pCW3, *Enterococcus* sp. plasmids pIP501, and others) [51, 52, 54]. In the meantime, it can be assumed that, like *A. tumefaciens* and *H. pylori* secretion systems, gram-positive bacteria can use the T4SS machinery both for delivery of single-stranded DNA molecules and for translocation of molecules promoting development of infectious processes; this assumption has already been supported by findings of some researchers. It has been found that adhesins secreted by T4SS-C of *E. faecalis* plasmid pCF10 promote the formation of biofilms and increase the enterococcal virulence [30]. Another example of T4SS-C participation in the pathogenesis of infectious diseases can be found in the data on the association between the Sp1 genomic pathogenicity island of *Streptococcus suis* and the outbreaks of toxic shock syndrome in 1998 and 2005 [55, 56]. Sp1, which is responsible for adaptive and virulent properties of the streptococcus, contains homologs of only 4

T4SS genes: *VirB1*, *VirB4*, *VirD4*, and *VirB6* [56, 57]. Despite its simple structure, this minimized secretion system retains its functional characteristics and is not only involved in the conjugative transfer of the pathogenicity island, but also plays a direct role in the virulence of *S. suis* [28, 29]. Thus, the secretion of protein virulence factors and translocation of T4SS-C MGEs provide evidence of the participation of this machinery in the pathogenesis of infections caused by gram-positive microorganisms, as it has been shown earlier for gram-negative bacteria.

Class C type 4 secretion system in *C. difficile*

Despite its potential significance in the pathogenesis of infection, T4SS-C in *C. difficile* is still poorly studied [58, 24]. The detailed structure of the secretion machinery has not been identified so far. In addition to *VirD4*, *VirB6*, and *VirB4* genes [24], which were identified using bioinformatics analysis, we discovered a gene presumably encoding a *VirB1* homolog in all three conjugative transposons: CTn4, CTn2, and CTn5 (the last two are referred to as CTn2/CTn5 in this article) [31]. In *C. difficile*, the conjugative part of CTn operons also includes methyltransferase, relaxase, helicase, and topoisomerase genes. Most likely, they encode components of relaxosome (Fig. 1, b), which is required for formation of transportable single-stranded DNA molecules and for DNA transfer to the secretion machinery similar to the process involving the *A. tumefaciens* VirD2 protein [25] and the TraA relaxase of plasmid pIP501 [51]. It is still unclear whether the gene product from the conjugative transposon, CD630_18580, belongs to T4SS-C, as, according to Bhatti et al. [34], it is an ortholog of *E. faecalis* adhesin pCF10 [30] and, by analogy with the enterococcal protein, can act as a virulence factor in *C. difficile*.

VirB4 and *VirD4* proteins are the most important components of bacterial T4SS; they take part in translocation as an energy source for transport of biomolecules. Both ATPases belong to conserved proteins of the secretion machinery [58, 59] and, consequently, are the best targets for taxonomic studies [60]. The phylogenetic analysis of sequences of *VirB4* and *VirD4*-like ATPases makes it possible to identify which class (A, B, or C) T4SS including the above enzymes should be assigned to (Fig. 2). Because of the differences in their structure, *C. difficile* *VirB4* and *VirD4* of transposons CTn4 and CTn2/CTn5 fall into different clades, which, together with ATPases of the pathogenicity island of *S. suis* constitute three taxonomically important groups within T4SS-C, thus implying that their functional significance can be different.

The only biochemical research addressing the clostridial T4SS mechanism and the above proteins has been recently conducted in our laboratory [31]. Based on our findings, both enzymes have an Mg²⁺-dependent

ОБЗОРЫ

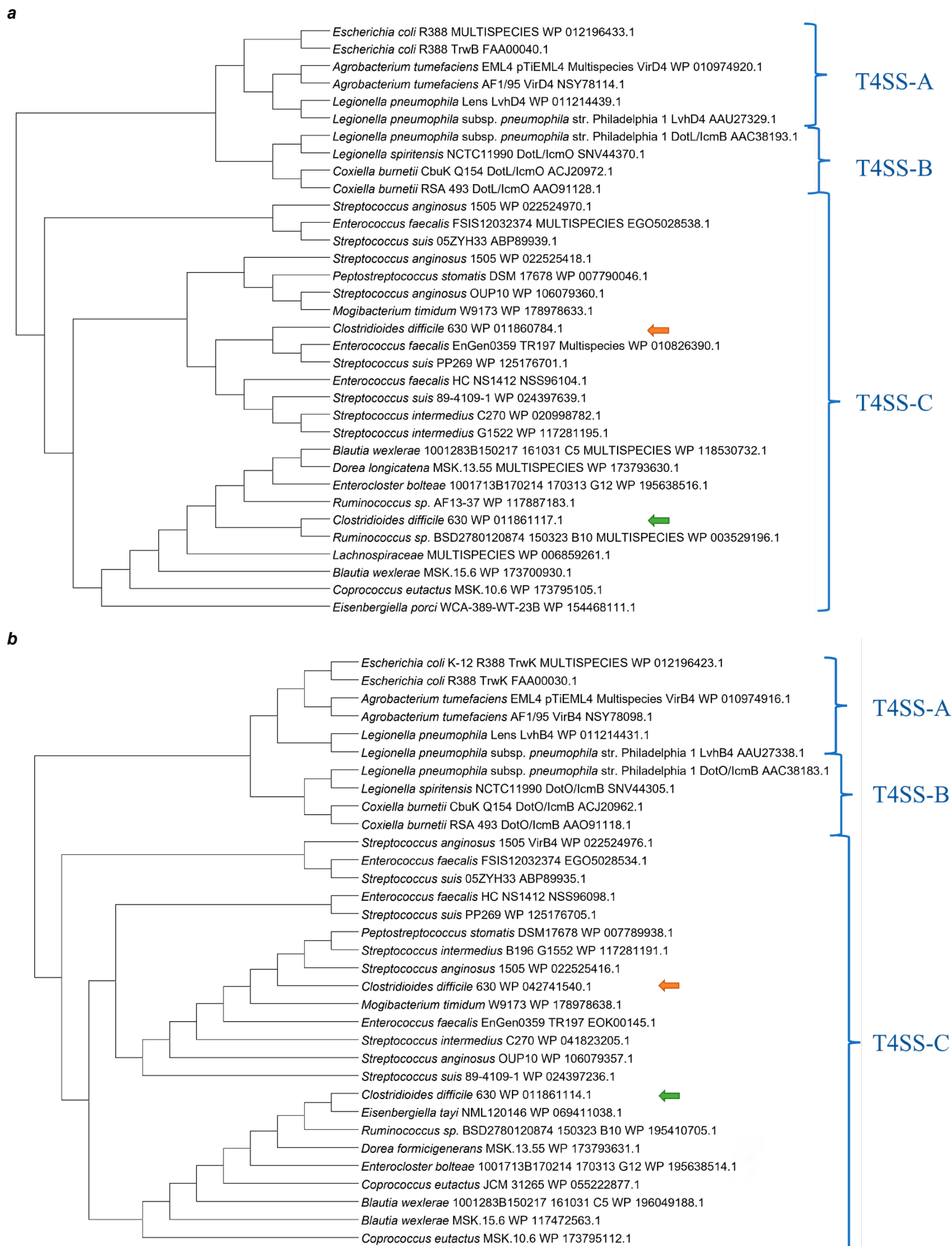


Fig. 2. Phylogenetic trees of VirD4- (a) and VirB4-like (b) proteins of gram-positive and gram-negative bacteria. The green arrow indicates CTn4 ATPases; the orange arrow indicates CTn2/5. The alignment was performed using MAFFT and K-align tools; trees were constructed using the maximum likelihood method and the Blosum62 matrix [31].

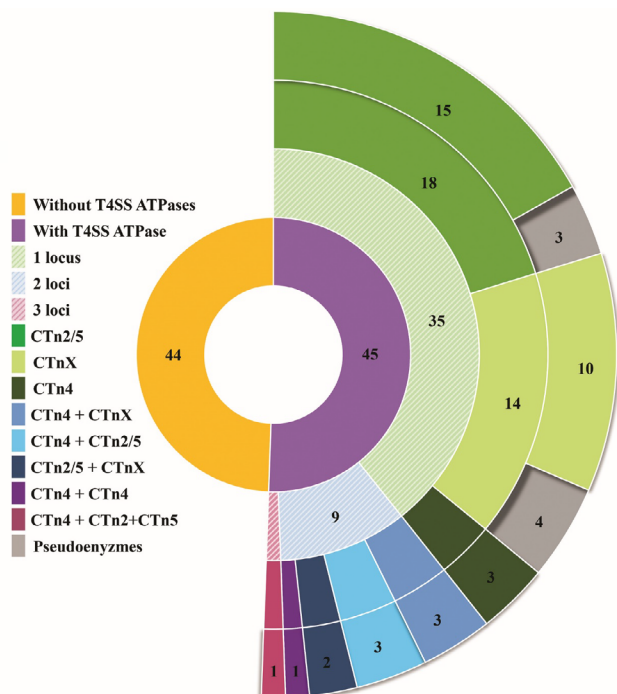


Fig. 3. Distribution of VirB4 and VirD4 T4SS-C ATPases among *C. difficile* strains with annotated genomes in the NCBI database.

In genomes, ATPases could be present in 1 (1 locus), 2 (2 loci), or 3 (3 loci) variants. If amino acid sequences were more than 87% identical to WP_011861117.1 (VirD4_{CTn4}) and WP_011861114.1 (VirB4_{CTn4}), we assigned them to the CTn4 group. If both sequences were more than 87% identical to WP_011860784.1 (VirD4_{CTn2/5}) and WP_042741540.1 (VirB4_{CTn2/5}), they were assigned to the CTn2/5 group. At lower values, ATPases were assigned to the CTnX group. The amino acid sequences lacking Walker A or Walker B motifs, which participate in the formation of oligomeric complexes and constitute the active center of the enzyme, were seen as damaged.

ATPase activity, and the maximum rate of the catalytic reaction is reached in the presence of potassium ions [31]. VirD4, but not VirB4 can interact with nucleic acid molecules. An important role in this interaction belongs to tryptophan at amino acid position 241, since the W241A point substitution results in a protein variant that is unable to adsorb DNA [31]. VirB4 and VirD4 form enzymatically active oligomeric complexes, while the substitution of the key amino acids in the so-called Walker A and Walker B motifs within enzyme domains not only decreases the ATPase activity, but also destabilizes the entire oligomeric complex [31]. The similarity between both ATPases and other T4SS ATPases in the amino acid composition (Fig. 2), biochemical and structural characteristics [31] suggests that this secretion machinery can translocate proteins like the secretion system of *S. suis* and *E. faecalis*. However, this hypothesis requires further research.

The presence of VirB4 and VirD4-like ATPases in strain 630 is neither unique nor rare. The frequency of occurrence of T4SS-C ATPases among representatives of *C. difficile* can be efficiently assessed using sequenced annotated genomes assembled into chromo-

somes. For the *C. difficile* species, a total of 17,961 sequenced genomes were deposited to the NCBI database by the end of 2022¹; 92 of them were annotated and assembled to the chromosome level, while 89 genomes, when duplicate variants are discarded, fall within the set parameters (Fig. 3). Half of such genomes (45 strains) contain T4SS-C ATPases in conjugative transposons; these amino acid sequences were not found in the other genomes using the Blast algorithm [Sorokina et al., unpublished data]. In 38 strains, the secretion machinery genes are not damaged (Fig. 3), thus being most likely functionally active. Only *C. difficile* 630 has three variants of genes of VirB4 and VirD4 ATPases, which are located in transposons CTn2, CTn4 and CTn5. In 10 genomes, both *VirB4* and *VirD4* were found in 2 loci (transposons), and, most frequently, each gene is represented by one copy. T4SS ATPases demonstrating low homology with ATPases of the known transposons CTn4 or CTn2/CTn5 (less than 80% of identity) are of special interest and require further research. By their structure, T4SSs-C that include the similar "new" variants of ATPases are highly similar to the systems in CTn4 or CTn2/CTn5, except for individual cases having the gene with the motifs typical of cell wall proteins (potential virulence factors) between topoisomerase and helicase genes [61, 62]. In the subset of this size, it is impossible to estimate the homogeneity of the latter group. On the whole, our taxonomic analysis makes it possible not only to identify strains with ATPases, which belong to the known subgroups (CTn4 or CTn2/CTn5), but also to detect new variants of the secretion machinery.

Conclusion

C. difficile infection remains a serious problem; the increasing frequency of nosocomial outbreaks and the emergence of community-acquired forms heighten the need for new prevention and treatment methods. Based on the findings of recent studies, we can conclude that MGEs contribute to high virulence *C. difficile*. T4SSs are significant components of MGEs; their impressive diversity in gram-positive microorganisms in general and in *C. difficile*, in particular, implies their high evolutionary and, consequently, medical significance. Initially capable of transferring genes involved in the adaptive response to adverse environmental factors, later on, T4SSs acquired the ability to transport protein molecules – virulence factors. These processes are convincingly described in publications addressing secretion systems in pathogenic gram-negative microorganisms. In gram-positive bacteria, specifically in *C. difficile*, this type of MGE participation in the pathogenesis of infectious diseases has been much more poorly studied. The composition of the secretion machinery

¹ URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/1496/>

has not been identified. In addition to the above VirB4 and VirD4 ATPases, as well as the VirB6 transmembrane channel protein, the secretion machinery may include the VirB1 homolog, relaxosome components, and adhesins. The latter, representing potential virulence factors, are of particular interest. Further studies of the composition and structure of entire T4SS-C as well as its individual components can significantly contribute to the progress in understanding the pathogenesis of the respective infections and help develop pathogenically grounded approaches to prevention and treatment of diseases caused by *C. difficile*.

REFERENCES

- Hall I.C., O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am. J. Dis. Child.* 1935;49(2):390.
DOI: <https://doi.org/10.1001/archpedi.1935.01970020105010>
- Riley T.V., Wymer V., Bamford V.W., Bowman R.A. *Clostridium difficile* in general practice and community health. *J. Hyg. (Lond.)*. 1986;96(1):13–7.
DOI: <https://doi.org/10.1017/s0022172400062483>
- Guh A.Y., Mu Y., Winston L.G., et al. Trends in U.S. Burden of *Clostridioides difficile* infection and outcomes. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(14):1320–30.
DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1910215>
- Lyerly D.M., Saum K.E., MacDonald D.K., Wilkins T.D. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect. Immun.* 1985;47(2):349–52.
DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.47.2.349-352.1985>
- Orrell K.E., Melnyk R.A. Large clostridial toxins: mechanisms and roles in disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2021;85(3):e0006421.
DOI: <https://doi.org/10.1128/mmbr.00064-21>
- Popoff M.R., Rubin E.J., Gill D.M., Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect. Immun.* 1988;56(9):2299–306.
DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.56.9.2299-2306.1988>
- Aktorics K., Papatheodorou P., Schwan C. Binary *Clostridium difficile* toxin (CDT) — a virulence factor disturbing the cytoskeleton. *Anaerobe.* 2018;53:21–9.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.001>
- Riedel T., Neumann-Schaal M., Wittmann J., et al. Characterization of *Clostridioides difficile* DSM 101085 with A–B–CDT+ phenotype from a late recurrent colonization. *Genome Biol. Evol.* 2020;12(5):566–77.
DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa072>
- Merrigan M.M., Venugopal A., Roxas J.L., et al. Surface-layer protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of *Clostridium difficile*. *PLoS One.* 2013;8(11):e78404.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078404>
- Shen A. *Clostridioides difficile* spore formation and germination: new insights and opportunities for intervention. *Annu. Rev. Microbiol.* 2020;74(1):545–66.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-011320-011321>
- Taggart M.G., Snelling W.J., Naughton P.J., et al. Biofilm regulation in *Clostridioides difficile*: novel systems linked to hypervirulence. *PLOS Pathog.* 2021;17(9):e1009817.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009817>
- de la Riva L., Willing S.E., Tate E.W., Fairweather N.F. Roles of cysteine proteases Cwp84 and Cwp13 in biogenesis of the cell wall of *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* 2011;193(13):3276–85. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00248-11>
- Coullon H., Candela T. *Clostridioides difficile* peptidoglycan modifications. *Curr. Opin. Microbiol.* 2022;65:156–61.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.11.010>
- McKee R.W., Harvest C.K., Tamayo R. Cyclic diguanylate regulates virulence factor genes via multiple riboswitches in *Clostridium difficile*. *mSphere.* 2018;3(5):e00423-18.
DOI: <https://doi.org/10.1128/msphere.00423-18>
- Buddle J.E., Fagan R.P. Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. *Virulence.* 2023;14(1):2150452.
DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150452>
- Androga G.O., Knight D.R., Hutton M.L., et al. *In silico*, *in vitro* and *in vivo* analysis of putative virulence factors identified in large clostridial toxin-negative, binary toxin-producing *C. difficile* strains. *Anaerobe.* 2019;60:102083.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102083>
- Lee A.S.Y., Song K.P. LuxS/autoinducer-2 quorum sensing molecule regulates transcriptional virulence gene expression in *Clostridium difficile*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;335(3):659–66.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.131>
- Okada Y., Okugawa S., Ikeda M., et al. Genetic diversity and epidemiology of accessory gene regulator loci in *Clostridioides difficile*. *Access Microbiol.* 2020;2(7):acmi.0.000134.
DOI: <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000134>
- Ahmed U.K.B., Shadid T.M., Larabee J.L., Ballard J.D. Combined and distinct roles of Agr proteins in *Clostridioides difficile* 630 sporulation, motility, and toxin production. *mBio.* 2020;11(6):e03190-20.
DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.03190-20>
- Aguilar-Zamora E., Weimer B.C., et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* in hospitalized patients from Mexico. *Front. Microbiol.* 2022;12:787451.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.787451>
- Wen X., Shen C., Xia J., et al. Whole-genome sequencing reveals the high nosocomial transmission and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* in a single center in China, a four-year retrospective study. 2021;10(1):e01322-21.
DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01322-21>
- Darkoh C., Keita K., Odo C., et al. Emergence of clinical *Clostridioides difficile* isolates with decreased susceptibility to vancomycin. *Clin. Infect. Dis.* 2022;74(1):120–6.
DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa912>
- Launay A., Ballard S.A., Johnson P.D., et al. Transfer of vancomycin resistance transposon Tn1549 from *Clostridium symbiosum* to *Enterococcus* spp. in the gut of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50(3):1054–62.
DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.50.3.1054-1062.2006>
- Zhang W., Cheng Y., Du P., et al. Genomic study of the type IVC secretion system in *Clostridium difficile*: understanding *C. difficile* evolution via horizontal gene transfer. *Genome.* 2017;60(1):8–16.
DOI: <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0053>
- Li Y.G., Christie P.J. The agrobacterium VirB/VirD4 T4SS: mechanism and architecture defined through *in vivo* mutagenesis and chimeric systems. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018;418:233–60. DOI: https://doi.org/10.1007/82_2018_94
- Böck D., Hüsler D., Steiner B., et al. The polar *Legionella* Icm/Dot T4SS establishes distinct contact sites with the pathogen vacuole membrane. *mBio.* 2021;12(5):e0218021.
DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.02180-21>
- Grohmann E., Christie P.J., Waksman G., Backert S. Type IV secretion in gram-negative and gram-positive bacteria: type IV secretion. *Mol. Microbiol.* 2018;107(4):455–71.
DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.13896>
- Zhao Y., Liu G., Li S., et al. Role of a type IV-like secretion system of *Streptococcus suis* 2 in the development of streptococcal toxic shock syndrome. *J. Infect. Dis.* 2011;204(2):274–81.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jir261>
- Zhong Q., Zhao Y., Chen T., et al. A functional peptidoglycan hydrolase characterized from T4SS in 89K pathogenicity island

- of epidemic *Streptococcus suis* serotype 2. *BMC Microbiol.* 2014;14:73. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-73>
30. Bhatti M., Cruz M.R., Frank K.L., et al. *Enterococcus faecalis* pCF10-encoded surface proteins PrgA, PrgB (aggregation substance), and PrgC contribute to plasmid transfer, biofilm formation, and virulence. *Mol. Microbiol.* 2015;95(4):660–77. DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.12893>
 31. Sorokina J., Sokolova I., Rybolovlev I., et al. VirB4- and VirD4-like ATPases, components of a putative type 4C secretion system in *Clostridioides difficile*. *J. Bacteriol.* 2021;203(21):e00359-21. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00359-21>
 32. Backert S. Erratum to: Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2017; 413:E1. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-75241-9_14
 33. Zhang W., Rong C., Chen C., Gao G.F. Type-IVC secretion system: a novel subclass of type IV secretion system (T4SS) common existing in gram-positive genus *Streptococcus*. *PLoS One.* 2012;7(10):e46390. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046390>
 34. Bhatti M., Laverde Gomez J.A., Christie P.J. The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Res. Microbiol.* 2013;164(6):620–39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.012>
 35. Wang J., Feng Y., Wang C., et al. Pathogenic *Streptococcus* strains employ novel escape strategy to inhibit bacteriostatic effect mediated by mammalian peptidoglycan recognition protein. *Cell. Microbiol.* 2017;19(7). DOI: <https://doi.org/10.1111/cmi.12724>
 36. Das A. Identification of a carboxy-terminal glutamine-rich domain in *Agrobacterium tumefaciens* coupling protein VirD4 required for recognition of T-Strand DNA and Not VirE2 as a substrate for transfer to plant cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2020;33(2):166–72. DOI: <https://doi.org/10.1094/mpmi-04-19-0099-r>
 37. Amro J., Black C., Jemouai Z., et al. Cryo-EM structure of the *Agrobacterium tumefaciens* T-pilus reveals the importance of positive charges in the lumen. *Structure.* 2023;31(4):375–84.e4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.str.2022.11.007>
 38. Roushan M.R., de Zeeuw M.A.M., Hooykaas P.J.J., van Heusden G.P.H. Application of phiLOV2.1 as a fluorescent marker for visualization of *Agrobacterium effector* protein translocation. *Plant J.* 2018;96(3):685–99. DOI: <https://doi.org/10.1111/tpj.14060>
 39. Chumakov M.I., Mazilov S.I., Gusev Yu.S., Volokhina I.V. Study of the ability of agrobacterial protein VirE2 to form pores in membranes. *Biological Membranes.* 2010;27(5):449–54. EDN: <https://www.elibrary.ru/mvskun>
 40. Dyubo Yu.V., Nikolaichik E.A. Modification virulent properties of *Pectobacterium atrosepticum* by conjugative plasmid PPA21A. *Molecular and Applied Genetics.* 2018;24:37–44. EDN: <https://www.elibrary.ru/hgoxko>
 41. Pfannkuch L., Hurwitz R., Traulsen J., et al. ADP heptose, a novel pathogen-associated molecular pattern identified in *Helicobacter pylori*. *FASEB J.* 2019;33(8):9087–99. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.201802555r>
 42. Zhang X., Li C., Chen D., et al. *H. pylori* CagA activates the NLRP3 inflammasome to promote gastric cancer cell migration and invasion. *Inflamm. Res.* 2022;71(1):141–55. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-021-01522-6>
 43. Allombert J., Jaboulay C., Michard C., et al. Deciphering *Legionella effector* delivery by Icm/Dot secretion system reveals a new role for c-di-GMP signaling. *J. Mol. Biol.* 2021;433(13):166985. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166985>
 44. Beare P.A., Gilk S.D., Larson C.L., et al. Dot/Icm type IVB secretion system requirements for *Coxiella burnetii* growth in human macrophages. *mBio.* 2011;2(4):e00175-11. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00175-11>
 45. Clemente T.M., Augusto L., Angara R.K., Gilk S.D. *Coxiella burnetii* actively blocks IL-17-induced oxidative stress in macrophages. *bioRxiv.* 2023;2023.03.15.532774. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.03.15.532774>
 46. Luo J., Wang L., Song L., Luo Z.Q. Exploitation of the host ubiquitin system: means by *Legionella pneumophila*. *Front. Microbiol.* 2021;12:790442. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.790442>
 47. Tartakovskaya D.I. Eukaryotic targets of cytotoxic glucosyltransferase *Legionella pneumophila*. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2012;2(1-2):325.
 48. Levanova N., Steinemann M., Böhmer K.E., Schneider S., et al. Characterization of the glucosyltransferase activity of *Legionella pneumophila* effector SetA. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2019;392(1):69–79. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1562-9>
 49. Liu L., Roy C.R. The *Legionella pneumophila* effector RavY contributes to a replication-permissive vacuolar environment during infection. *Infect. Immun.* 2021;89(12):e0026121. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00261-21>
 50. Kurenbach B., Bohn C., Prabhu J., et al. Intergeneric transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pIP501 to *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* and sequence analysis of its tra region. *Plasmid.* 2003;50(1):86–93. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(03\)00044-1](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(03)00044-1)
 51. Abajy M.Y., Kopeć J., Schiwon K., et al. A type IV-secretion-like system is required for conjugative DNA transport of broad-host-range plasmid pIP501 in Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 2007;189(6):2487–96. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.01491-06>
 52. Kohler V., Vaishampayan A., Grohmann E. Broad-host-range Inc18 plasmids: occurrence, spread and transfer mechanisms. *Plasmid.* 2018;99:11–21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.06.001>
 53. Durie C.L., Sheedlo M.J., Chung J.M., et al. Structural analysis of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm type IV secretion system core complex. *eLife.* 2020;9:e59530. DOI: <https://doi.org/10.7554/elife.59530>
 54. Revitt-Mills S.A., Watts T.D., Lyras D., et al. The ever-expanding tcp conjugation locus of pCW3 from *Clostridium perfringens*. *Plasmid.* 2021;113:102516. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2020.102516>
 55. Tang J., Wang C., Feng Y., et al. *Streptococcal* toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med.* 2006; 3(5):e151. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030151>
 56. Li M., Wang C., Feng Y., et al. Salk/SalR, a two-component signal transduction system, is essential for full virulence of highly invasive *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS One.* 2008;3(5):e2080. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002080>
 57. Li M., Shen X., Yan J., et al. GI-type T4SS-mediated horizontal transfer of the 89K pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis* serotype 2: T4SS-mediated transfer of 89K PAI in *S. suis* 2. *Mol. Microbiol.* 2011;79(6):1670–83. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07553.x>
 58. Li N., Jia H., Yang H., et al. Preliminary screening of type IV secretion system in divergent geographic sources of *Clostridium difficile*. *Exp. Ther. Med.* 2017;14(5):4405–10. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5065>
 59. Whitaker N., Berry T.M., Rosenthal N., et al. Chimeric coupling proteins mediate transfer of heterologous type IV effectors through the *Escherichia coli* pKM101-encoded conjugation machine. *J. Bacteriol.* 2016;198(19):2701–18. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00378-16>
 60. Fernández-López R., Garcillán-Barcia M.P., Revilla C., et al. Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006;30(6):942–66. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00042.x>

ОБЗОРЫ

61. Tulli L., Marchi S., Petracca R., et al. CbpA: a novel surface exposed adhesin of *Clostridium difficile* targeting human collagen: collagen binding protein of *Clostridium difficile*. *Cell. Microbiol.* 2013;15(10):1674–87.
DOI: <https://doi.org/10.1111/cmi.12139>

Information about the authors

Julya V. Sorokina[✉] — researcher, Department of bacterial infections, Gamaleya Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, yv_sorokina@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0002-1869-742X>

Yuriy F. Belyi — D. Sci. (Med.), Head. Department of bacterial infections, Gamaleya Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2312-1465>

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 28.03.2023;
accepted for publication 15.07.2023;
published 28.08.2023

62. Malik A., Shoombuatong W., Kim C.B., Manavalan B. GPAPred: The first computational predictor for identifying proteins with LPXTG-like motif using sequence-based optimal features. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023;229:529–38.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.315>

Информация об авторах

Сорокина Юлия Валерьевна[✉] — н.с. отдела бактериальных инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, yv_sorokina@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0002-1869-742X>

Белый Юрий Федорович — д.м.н., рук. отдела бактериальных инфекций НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2312-1465>

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 28.03.2023;
принята к публикации 15.07.2023;
опубликована 28.08.2023

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-383>

Перспективные фармацевтические разработки вакцин для профилактики менингококковой инфекции

Савкина М.В.✉, Саяпина Л.В., Кривых М.А., Обухов Ю.И.

Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия

Аннотация

Менингококковая инфекция (МИ) относится к антропонозам; представляет собой острое инфекционное заболевание с аэрозольным механизмом передачи, характеризующееся различными формами инфекционного процесса: от локальной (назофарингит) и бессимптомной до генерализованных форм в виде инвазивной инфекции с развитием менингококцемии и менингита. Возбудителем МИ является менингококк (*Neisseria meningitidis*), относящийся к III группе патогенности. Профилактические прививки против МИ включены в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Проблема МИ имеет важное медико-социальное значение для российского здравоохранения в связи с сохраняющимися высокими показателями летальности, инвалидизацией, высокими затратами на лечение и реабилитацию. В мире зарегистрированы вакцины против 5 из 6 основных серогрупп *N. meningitidis*. Вакцина против серогруппы X находится на стадии разработки. В последнее время отмечается увеличение гетерогенности популяции менингококка, обусловленное серогруппами W, Y и X. Разработанные в России полисахаридные вакцины имеют ограничения по применению, а производство по полному циклу на территории России конъюгированных менингококковых вакцин отсутствует. Учитывая вышеизложенное, разработка и регистрация новых вакцин против МИ является актуальной задачей.

Цель работы — анализ современного состояния в области разработок вакцин для профилактики МИ.

В зависимости от технологии получения имеются следующие виды менингококковых вакцин: полисахаридные, конъюгированные, на основе везикул наружной мембраны (ВНМ), белковые и на основе синтетических полисахаридов. Менингококковые вакцины, направленные к отдельным серогруппам, являются эффективными в снижении бремени инвазивной МИ для общественного здравоохранения. Полисахаридные конъюгированные и белковые/ВНМ вакцины относятся к наиболее перспективным вакцинам и нацелены на борьбу с большинством инвазивных серогрупп менингококка. В современных условиях с развитием технологий в области создания полисахаридных конъюгированных вакцин будущего открываются новые возможности использования таких подходов, как химический/химико-ферментный синтез, улучшенная характеристика белка-носителя и сайт-специфическая конъюгация. Не теряет своей актуальности разработка единой вакцины против основных инвазивных серогрупп менингококка, а не его отдельных антигенных вариантов. Своевременной является разработка вакцины против *N. meningitidis* серогруппы X, являющейся редкой причиной возникновения спорадического менингита и вызвавшей вспышки в 2006–2010 гг. в различных странах Африки.

Ключевые слова: менингококковая инфекция, *Neisseria meningitidis*, полисахаридные и конъюгированные вакцины, вакцины на основе везикул наружной мембраны, обзор

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (№ гос. учета НИР 121022000147-4).

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

Для цитирования: Савкина М.В., Саяпина Л.В., Кривых М.А., Обухов Ю.И. Перспективные фармацевтические разработки вакцин для профилактики менингококковой инфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):354–363.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-383>

EDN: <https://www.elibrary.ru/ryvxkq>

Promising pharmaceutical development of vaccines for the prevention of meningococcal infection

Maria V. Savkina[✉], Lidiya V. Sayapina, Maxim A. Krivykh, Yury I. Obukhov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia

Abstract

Meningococcal infection (MI) refers to anthroponoses; is an acute infectious disease with an aerosol transmission mechanism, characterized by various forms of the infectious process: from local (nasopharyngitis) and asymptomatic infections to generalized forms of invasive infection with the development of meningococemia and meningitis. The causative agent of MI is meningococcus (*Neisseria meningitidis*) that belongs to the pathogen risk group 2. Preventive vaccination against MI is included in the calendar of preventive vaccinations according to epidemic indications. The problem of MI retains a great medical and social significance for Russian health care due to the continuing high rates of associated mortality, disability, high costs of treatment and rehabilitation. Vaccines against five of the six main *N. meningitidis* serogroups have been registered worldwide. Serogroup X vaccine is under development. Recently, there has been an increase in the heterogeneity of the meningococcal population due to serogroups W, Y, and X. The polysaccharide vaccines developed in Russia have restrictions on their use, and there is no full-cycle production of meningococcal conjugate vaccines in the Russian Federation. Given the above, the development and registration of new vaccines against MI is an urgent task.

The **purpose** of this work is to analyze the current state of development of vaccines for MI prevention. Currently, depending on the production technology, the following types of meningococcal vaccines are available: polysaccharide, conjugated, based on outer membrane vesicles (OMV), protein and based on synthetic polysaccharides. Serogroup-targeted meningococcal vaccines are effective in reducing the public health burden of invasive MI. Polysaccharide conjugate and protein/OMV vaccines are among the most promising vaccines for most invasive meningococcal serogroups. In modern conditions, with the progress in technologies for future polysaccharide conjugate vaccines, new opportunities are opening up for the use of such approaches as chemical/enzymatic synthesis, improved characteristics of the carrier protein, and site-specific conjugation. The development of a single vaccine against the main invasive meningococcal serogroups, rather than its individual antigenic variants, does not lose its relevance. It is timely to develop in the near future a vaccine against *N. meningitidis* serogroup X, which was previously a rare cause of sporadic meningitis, but has caused outbreaks in various African countries in 2006–2010 and in recent years.

Keywords: meningococcal infection, *Neisseria meningitidis*, polysaccharide and conjugate vaccines, vaccines based on outer membrane vesicles, review

Funding source. The work was carried out within the framework of the state assignment of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products No. 056-00052-23-00 for applied scientific research (state registration number NIR 121022000147-4).

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

For citation: Savkina M.V., Sayapina L.V., Krivykh M.A., Obukhov Yu.I. Promising pharmaceutical development of vaccines for the prevention of meningococcal infection. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(4):354–363. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-383>. EDN: <https://www.elibrary.ru/ryvxxkq>

Менингококковая инфекция (МИ) относится к антропонозам¹; представляет собой острое инфекционное заболевание с аэрозольным механизмом передачи, характеризующееся различными формами инфекционного процесса: от локальной (назофарингит) и бессимптомной (бактерионосительство) до ге-

нерализованных форм в виде инвазивной инфекции с развитием менингококцемии и менингита.

Возбудителем МИ является менингококк (*Neisseria meningitidis*), относящийся к III группе патогенности. По структуре полисахаридной капсулы менингококки подразделяются на 12 серогрупп: А, В, С, X, Y, Z, W, E, K, H, L, I. Для МИ свойственна периодичность (подъемы заболеваемости в среднем возникают через длительные межэпидемические периоды от 10 до 30 лет). Спорадическая заболеваемость межэпидемического периода формируется

¹ Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4 «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

разными серогруппами, из которых основными являются А, В, С, W, Y, X² [1].

Самая высокая заболеваемость МИ в мире с частыми эпидемиями зарегистрирована в Африке (более 25 стран). Заболевание, вызванное возбудителем *N. meningitidis* серогруппы А, наблюдается в «поясе менингита» в Африке к югу от Сахары (включает 22 страны и простирается от Эфиопии до Сенегала), а также в Юго-Восточной Азии. Заболевание, вызываемое *N. meningitidis* серогруппы W, распространено в некоторых частях Африки и Южной Америки. Данная серогруппа ответственна за эпидемию, которая произошла во время хаджа в Мекку почти 20 лет назад. Заболеваемость МИ серогруппы Y растёт в Северной Америке и Европе. Серогруппа X всё чаще встречается в регионах Африки [2]. Серогруппа В является ведущей при невысокой заболеваемости в США и в странах Западной Европы, особенно после подавления эпидемического подъёма, вызванного серогруппой С. В конце XX в. в Новой Зеландии регистрировалась повышенная заболеваемость МИ также за счёт серогруппы В [3]. Возникали эпидемии в Норвегии, странах Латинской Америки [4].

В России характеристика штаммов менингококка, выделенных от лиц с диагнозом «генерализованная форма МИ», представлена преимущественно серогруппами А, В, С в равных долях, отмечается также увеличение гетерогенности популяции менингококка, обусловленное ростом штаммов редких серогрупп (W, Y)².

Вакцинация против МИ включена в Календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям³. Для обеспечения максимальной эффективности иммунизации и формирования популяционного иммунитета при проведении вакцинации используются вакцины с наибольшим набором серогрупп возбудителя [4]. Исторические аспекты создания менингококковых вакцин (МВ) и история их применения изложены в статье М.В. Абрамцевой [5].

Проблема МИ имеет медико-социальную значимость для российского здравоохранения в связи с сохраняющимися высокими показателями летальности и инвалидизацией, высокими затратами на лечение и реабилитацию. В мире зарегистрированы МВ против 5 (А, В, С, W, Y) из 6 (А, В, С, W, Y, X) основных серогрупп *N. meningitidis*. В последнее время отмечается увеличение гетерогенности попу-

ляции менингококка, обусловленное серогруппами W, Y и X. Разработанные в России полисахаридные вакцины против серогруппы А и серогрупп А + С имеют ограничения по применению, а производство по полному циклу на территории России конъюгированных МВ отсутствует. Таким образом, разработка и регистрация новых МВ является актуальной задачей.

Цель данной работы — анализ современного состояния в области разработок вакцин для профилактики МИ.

В России зарегистрированы 6 наименований МВ: 2 МВ отечественного производства («Микроген») и 4 МВ зарубежных производителей («Sanofi Pasteur Inc.» и «GlaxoSmithKline» (таблица). В мире разработаны и зарегистрированы эффективные МВ против серогрупп *N. meningitidis* А, С, W и Y на основе полисахаридов и конъюгированные. Для профилактики инфекции, вызванной *N. meningitidis* серогруппы В, зарегистрированы белковые вакцины.

Полисахаридные вакцины

Полисахаридные МВ стали доступны для использования с 1970-х гг. Четырехвалентные полисахаридные вакцины серогрупп А, С, W и Y (Mencevax, «GSK Vaccines»; Menomune, «Sanofi Pasteur») были лицензированы в 1980-х гг. Применяемые в настоящее время полисахаридные МВ содержат капсульные полисахариды штаммов соответствующих серогрупп (А, С, W и Y). В результате иммунизации класса вакцин в организме привитого индуцируется кратковременный, независимый от Т-клеток иммунный ответ [1].

В России применяются две полисахаридные вакцины отечественного производства (АО НПО «Микроген»), содержащие полисахариды менингококка серогруппы А и серогрупп А+С (таблица).

Вместе с тем ограничения по применению четырехвалентных вакцин, включая низкую иммуногенность у детей в возрасте до 2 лет, отсутствие иммунологической памяти и высокую реактогенность, явились основанием для разработки конъюгированных МВ, в которых капсульные полисахариды ковалентно связаны с белком-носителем [1].

Конъюгированные вакцины

Конъюгированные полисахаридные вакцины вызывают более продолжительный иммунный ответ и являются основным классом вакцин, применяемых для активной профилактики инфекции, вызываемой *N. meningitidis* серогрупп А, С, W и Y [2]. В вакцинах против МИ используются три основных типа белков-носителей: дифтерийный анатоксин, его рекомбинантный фрагмент с заменой аминокислоты 197, которая делает его неактивным (CRM₁₉₇), и столбнячный анатоксин, представляющие собой инактивированные формы бактериальных экзоток-

² Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4 «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

³ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21.03.2014 № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям».

ОБЗОРЫ

Зарегистрированные в России МВ
 Meningococcal vaccines registered in Russia

Торговое наименование Trade name	Состав Composition	Показания к применению Indications for use
МВ основе полисахаридов Meningococcal polysaccharide vaccines		
Вакцина менингококковая группы А полисахаридная Group A meningococcal vaccine, polysaccharide	Полисахариды менингококка серогруппы А Polysaccharides of serogroup A meningococcus	Профилактика генерализованных форм МИ, вызванной менингококком серогруппы А, у детей от 1 года, подростков и взрослых Prevention of generalized forms of meningococcal infection caused by serogroup A meningococcus in children from 1 year old, adolescents and adults
МенингоВак А+С Вакцина менингококковая групп А и С полисахаридная MeningoVac A+C Meningococcal group A and C polysaccharide vaccine	Полисахариды менингококка серогрупп А, С Meningococcal serogroup A, C polysaccharides	Вакцинация взрослых от 18 до 60 лет: в очагах МИ, вызванной менингококками серогрупп А или С; в эндемичных регионах, а также в случае эпидемии, вызванной менингококками серогрупп А или С; вакцинация лиц, подлежащих призыву на военную службу Vaccination of adults from 18 to 60 years of age: in foci of meningococcal infection caused by meningococci of serogroups A or C; in endemic regions, as well as in the case of an epidemic caused by meningococci of serogroups A or C; vaccination of persons subject to conscription for military service
Менингококковые конъюгированные вакцины Meningococcal conjugate vaccines		
МЕНАКТРА MENAKTRA	Полисахариды менингококка серогрупп А, С, W ₁₃₅ , Y, конъюгированные с дифтерийным анатоксином Polysaccharides of meningococcal serogroups A, C, W ₁₃₅ , Y conjugated with diphtheria toxoid	Профилактика инвазивной МИ, вызванной <i>N. meningitidis</i> серогрупп А, С, Y и W ₁₃₅ , у лиц в возрасте от 9 мес до 55 лет Prevention of invasive meningococcal infection caused by <i>N. meningitidis</i> serogroups A, C, Y and W ₁₃₅ in persons aged 9 months and older up to 55 years
Менвео Menveo	Олигосахариды менингококка серогруппы А, С, W ₁₃₅ , Y, конъюгированные с белком CRM ₁₉₇ Oligosaccharides of meningococcal serogroups A, C, W ₁₃₅ , Y conjugated with CRM ₁₉₇ protein	Профилактика инвазивных форм МИ, вызванных <i>N. meningitidis</i> серогрупп А, С, W ₁₃₅ и Y, у детей с 2 мес, подростков и взрослых Prevention of invasive forms of meningococcal infection caused by <i>N. meningitidis</i> serogroups A, C, W ₁₃₅ and Y in children from 2 months, adolescents and adults
МенКвадфи MenQuadfi	Полисахариды менингококка серогрупп А, С, W ₁₃₅ , Y, конъюгированные со столбнячным анатоксином Polysaccharides of meningococcal serogroups A, C, W ₁₃₅ , Y conjugated with tetanus toxoid	Профилактика МИ, вызванной <i>N. meningitidis</i> серогрупп А, С, W ₁₃₅ и Y, у детей с 12 мес, подростков, взрослых и пожилых Prevention of meningococcal infection caused by <i>N. meningitidis</i> serogroups A, C, W ₁₃₅ and Y in children from 12 months, adolescents, adults and the elderly
Белковые вакцины Protein vaccines		
Бексеро Behexo	Рекомбинантные гибридные белки <i>N. meningitidis</i> серогруппы В и везикулы наружной мембраны (ВНМ) <i>N. meningitidis</i> серогруппы В <i>N. meningitidis</i> serogroup B recombinant fusion proteins and <i>N. meningitidis</i> serogroup B outer membrane vesicles	Профилактика МИ, вызванной <i>N. meningitidis</i> серогруппы В, для лиц в возрасте 2 мес и старше Prevention of <i>N. meningitidis</i> serogroup B meningococcal disease in persons 2 months of age and older

Источник: Государственный реестр лекарственных средств. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru>
 Source: State Register of Medicines. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru>

синов и обладающие высокой иммуногенностью. Белки-носители имеют решающее значение для индукции В-клеток и Т-клеточнозависимых иммунных ответов, формирующих иммунологическую память.

Современные конъюгированные МВ доступны к использованию в моновалентной, четырехвалентной и комбинированной формах с капсульным антигеном *Haemophilus influenzae b* (Hib) [3]. Применение МВ, содержащих полисахариды одной или нескольких серогрупп, осуществляется

в соответствии с эпидемиологическими данными о заболеваемости и циркулирующих серогруппах *N. meningitidis* и эффективности, подтвержденной клиническими испытаниями [2].

В исследовании, проведенном М. Tontini и соавт. в 2016 г., изучены 28 потенциальных белков-носителей из различных серотипов бактерий [6]. При этом белки были конъюгированы с модельным полисахаридом и 8 из них были выбраны в качестве потенциальных носителей различных серогрупп

N. meningitidis. Полученные результаты показали, что 4 конъюгата вырабатывают антитела у мышей, которые были иммунореактивны к серогруппе С, а один вызывал образование антител против серогрупп А, С, W, Y и X. Учёные пришли к выводу, что из всех используемых конъюгатов белок-носитель, полученный из *Streptococcus pneumoniae*, может быть дополнительно оптимизирован как белок-носитель нового поколения менингококковых капсульных полисахаридов для серогрупп А, С, W, Y и X и использоваться при разработке МВ [6].

Моновалентные конъюгированные вакцины

В мире лицензированы 3 моновалентные конъюгированные вакцины против *N. meningitidis* серогруппы С и 1 моновалентная вакцина против серогруппы А. Две вакцины серогруппы С: Meningitec («Pfizer») и Menjugate («GlaxoSmithKline») в качестве носителя используют CRM₁₉₇, в то время как другая вакцина, NeisVac-C («Pfizer»), использует белок-носитель, производный столбнячного токсина. Все три вакцины эффективны у детей в возрасте 2 мес и старше [7]. Недорогая моновалентная конъюгированная вакцина серогруппы А с применением белка-носителя столбнячного токсина (MenAfriVac от Института сыворотки Индии) была разработана для менингитного пояса в Африке к югу от Сахары. Данная конъюгированная вакцина предназначена для применения в более широкой возрастной группе (от 1 года до 29 лет) [8].

Четырёхвалентные конъюгированные вакцины

В последние десятилетия были разработаны и зарегистрированы в нескольких странах три конъюгированные четырёхвалентные вакцины серогрупп АСWY: Menactra (MenACWY-DT, «Sanofi Pasteur») лицензирована в 2005 г., Menveo (MenACWY-CRM₁₉₇, «GSK Vaccines») — в 2010 г., Nimenrix (MenACWY-TT, «Pfizer») — в 2012 г. [2]. MenACWY-DT и MenACWY-CRM₁₉₇ лицензированы в США для людей в возрасте от 9 мес до 55 лет и от 2 мес до 55 лет соответственно [2]. MenACWY-CRM₁₉₇ также лицензирована для людей в возрасте старше 2 мес⁴. MenACWY-TT («Nimenrix») была впервые лицензирована в Европе в 2016 г. для детей в возрасте старше 6 нед [9]. Вакцина MenQuadfi (MenACWY-TT; «Sanofi Pasteur») была одобрена в США для детей старше 12 мес и в ЕС⁴ [1], в России данная вакцина зарегистрирована в декабре 2022 г.⁵

В России производство по полному циклу конъюгированных МВ не осуществляется. Сло-

жившаяся ситуация не может не вызывать беспокойства с учётом непродолжительной длительности межэпидемического периода в стране и прогресса в разработке МВ в других странах [4].

Комбинированные конъюгированные вакцины

MenHibrix (Hib-MenCY-TT) и Menitorix (Hib-MenC-TT) представляют собой комбинированные конъюгированные вакцины, содержащие капсульные полисахариды *N. meningitidis* определённых серогрупп и Hib, которая вызывает пневмонию и менингит у детей в возрасте до 5 лет [2, 10]. В качестве антигена MenHibrix и Menitorix содержат полирибозилрибитолфосфат, являющийся основным компонентом капсулы Hib. MenHibrix применяется у детей в возрасте от 6 нед до 18 мес. Menitorix используют для профилактики инвазивной инфекции, вызванной *N. meningitidis* или Hib, у детей в возрасте от 6 нед до 2 лет. Первичная вакцинация состоит из 3 доз вакцины, вводимых с интервалом 1 мес. Ревакцинация проводится в возрасте от 12 мес до 2 лет введением одной дозы вакцины [2].

Вакцины на основе везикул наружной мембраны

Разработка конъюгированных МВ, содержащих полисахариды серогруппы В, в отличие от других серогрупп, была ограничена низкой иммуногенностью и риском развития аутоиммунных реакций, связанных с высокой степенью гомологии углеводных фрагментов *N. meningitidis* серогруппы В с углеводами, широко распространёнными в организме человека [2]. Гликоконъюгаты с применением модифицированной сиаловой кислоты, N-пропионирированной сиаловой кислоты, использовались в некоторых клинических исследованиях, но ещё не достигли стадии лицензирования [2, 11].

Первая вакцина против *N. meningitidis* серогруппы В, не содержащая гликаны, разработана на основе ВНМ и лицензирована на Кубе [12]. ВНМ представляют собой везикулы естественного происхождения, выделяемые грамотрицательными бактериями, которые содержат фосфолипиды, липополисахариды и мембранные белки. Все эти компоненты сами по себе могут быть антигенами, которые распознаются антителами хозяина и могут действовать как самоадьюванты.

В качестве перспективных протективных антигенов менингококка, входящих в состав «пузырьковых» вакцин, рассматриваются порины PorA и PorB [4].

Установлено, что вакцины на основе ВНМ обладают относительно невысокой эффективностью, т.к. иммунный ответ направлен только на введённые антигены и из-за гетерогенности антигенной структуры, особенно по порину PorA и белкам наружной мембраны Орс, перекрёстная защита против всей

⁴ URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/menquadfi>

⁵ Государственный реестр лекарственных средств
URL: <http://grls.rosminzdrav.ru>

популяции менингококка серогруппы В отсутствует [4]. Кроме того, «пузырьковые» вакцины могут применяться только при узких локальных эпидемиях, вызванных однородной антигенной разновидностью менингококка серогруппы В, и являются недостаточными иммуногенными для детей первых лет жизни [4].

Примером поливалентной (по PоrA) МВ против менингококка серогруппы В является вакцина НехаМен, разработанная в Нидерландах. Данная «пузырьковая» вакцина содержит ВНМ из двух рекомбинантных сконструированных штаммов, каждый из которых экспрессирует три различных подтипа PоrA [13]. В результате проведённых исследований установлено, что НехаМен является безопасной и иммуногенной вакциной [14].

Более успешным примером вакцины на основе ВНМ является четырёхкомпонентная вакцина 4СМенВ (Bexsero) против менингококка серогруппы В, содержащая, помимо ВНМ, ещё и три белка: NadA, fHbp и NHBA [2, 10, 15]. Эти белки отличаются не только высокой протективной активностью, но и являются высоко консервативными. Проведённый анализ варибельности последовательности белка, связывающего фактор Н (fHbp), гепаринсвязывающего антигена *Neisseria* (NHBA) и адгезина *A Neisseria* (NadA) с использованием панели инвазивных изолятов, собранных в Нидерландах в течение 50 лет, показал, что описанные субварианты антигенов сохраняются с течением времени и стимулируются отбором [16].

Вакцина 4СМенВ⁶ одобрена в Европе для трехкратной иммунизации младенцев с 2-месячного возраста с 2 последующими ревакцинациями [17], зарегистрирована в России в апреле 2022 г.

Организован выпуск ещё одной удачно сконструированной вакцины на основе подхода «обратной вакцинологии», содержащей только варианты белка, связывающего фактор Н комплемента — fHbp (Trumenba) [4]. В предварительных исследованиях бивалентной рекомбинантной липопротеиновой вакцины показано, что она является моногенной и индуцирует устойчивую активность комплемента в отношении различных инвазивных штаммов менингококка серогруппы В. Помимо этого вакцина хорошо переносится и не вызывает нежелательных явлений при введении. На основании полученных данных S. Nadel сделал заключение о том, что рекомбинантная липопротеиновая МВ может рассматриваться как вакцина-кандидат, предназначенная для защиты от инвазивного менингококка серогруппы В широкого спектра [18].

Вакцина Trumenba (вакцина менингококковая группы В рекомбинантная, адсорбированная)⁷,

предназначенная для профилактики лиц от 10 лет до 25 лет, подверженных повышенному риску инвазивной МИ, вызываемой *N. meningitidis* серогруппы В, лицензирована в США (2014 г.) и в ЕС (2017 г.) [19].

Вакцины на основе синтетических полисахаридных антигенов *N. meningitidis*

Основными проблемами использования в МВ капсульных полисахаридов, выделенных из культур *N. meningitidis*, являются сложность их выделения, очистки и стандартизации, а также низкие коэффициенты конъюгации с белками-носителями [20]. В связи с этим разработана технология производства получения менингококковых углеводных антигенов путём химического или химико-ферментативного синтеза, позволяющего контролировать качество олигосахаридов. Полученные химическими или химико-ферментативными методами олигосахариды конъюгируют с белками-носителями и достаточно широко используют для получения конъюгированных вакцин-кандидатов [21].

Исследовали менингококковые капсульные олигосахариды серогруппы W с различной длиной цепи (степенью полимеризации DP), полученные в ходе химического синтеза и конъюгированные с белком-носителем [22]. Сконструированные конъюгаты использовали для иммунизации мышей. Установлено, что бактерицидные антитела в сыворотке крови животных вырабатывались при иммунизации вакцинами-кандидатами, содержащими DP4–DP10, в то время как содержание DP2 не вызывало выработку бактерицидных антител. Полученные результаты позволили предположить, что две повторяющиеся единицы являются минимальной единицей, необходимой для получения иммуногенности. Имеются данные исследований, проведённых группой учёных под руководством А.К. Misra, которые синтезировали тетрамерную повторяющуюся единицу капсульного полисахарида *N. meningitidis* A [23]. После иммунизации мышей конъюгированным менингококковым капсульным олигосахаридом с белком-носителем SA в сыворотке крови обнаруживались антитела, способные уничтожать *N. meningitidis* серогруппы A [23].

Последние исследования были сосредоточены в области химико-ферментативного синтеза олигосахаридов *N. meningitidis* [24]. На данный момент все гликозилтрансферазы, ответственные за синтез капсульных полисахаридов инвазивных сергрупп менингококка, экспрессируются в рекомбинантной форме [2]. Группа учёных под руководством W.F. Vann использовала модифицированные акцепторы для получения олигосахаридов из *N. meningitidis* серогруппы C, которые были конъю-

⁶ URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/bexsero>

⁷ URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/trumenba>

trumenba

югированы с фрагментом белка-носителя ТТ [25]. В эксперименте у мышей, иммунизированных полученными вакцинами-кандидатами, авторам удалось обнаружить антитела в сыворотке крови животных к полисахариду серогруппы С. Кроме того, химико-ферментативный синтез потенциальных компонентов вакцины был выполнен с использованием серогрупп А, Х, W и Y [2]. Группа исследователей под руководством R. Gerardy-Schann создала конъюгированную рекомбинантную форму капсульной полимеразы серогруппы Х [2]. Олигосахариды, полученные ферментативным путём, были конъюгированы с CRM197. Установлено, что антитела, полученные в результате иммунизации, активны в бактерицидном анализе сыворотки [2]. В работе T. Fiebig и соавт. описан подход оптимизации твердофазного метода с использованием иммобилизованных гликозилтрансфераз для получения олигосахаридов серогрупп А и Х [26]. С использованием генной инженерии ферменты были оптимизированы для производства продуктов с определённой олигосахаридной цепью [26].

Вакцины с системой доставки на основе наночастиц

Наночастицы представляют собой небольшие сферические соединения нанометрового размера, которые имеют антигены, ковалентно прикреплённые или нековалентно встроенные в поверхность или полностью инкапсулированные частицами [2]. Типы наночастиц, которые были исследованы для общего использования в вакцинах, включают вирусоподобные частицы, липосомы, иммуностимулирующие комплексы, полимерные наночастицы, неразлагаемые наночастицы. Большинство исследований для *N. meningitidis* было сосредоточено на липосомах [2].

Группа исследователей под руководством J.J. Mekalanos провела работу с компонентами системы секреции бактерий IV типа (Т6SS), ответственных за перемещение белков между клетками [27]. Для этого цитоплазматические оболочки, содержащие гетеродимеры белков VipA–VipB из Т6SS, были экспрессированы и соединены с белковым антигеном fHbp *N. meningitidis* серогруппы В. Выявлено, что у мышей, иммунизированных цитоплазматическими оболочками, объединёнными с белковым антигеном fHbp, формируется высокий иммунный ответ. Кроме того, выявлялись антигенспецифические антитела, вырабатываемые против оболочек, представляющих антиген, связывающий белок фактора Н *N. meningitidis* (fHbp), которые имели высокую функциональную активность. Таким образом, полученные результаты показывают, что мультвалентные наночастицы на основе оболочки Т6SS представляют собой универсальный каркас для применения в вакцинах [27].

Исследования «GlaxoSmithKline» были направлены на разработку нового состава вакцины MenC-CRM197 с использованием эмульсии иммуностимулирующего комплекса, предназначенной для внутрикожного введения взамен внутримышечного [28]. Одним из преимуществ этого пути введения является то, что в коже больше антигенпрезентирующих клеток, которые обеспечивают более высокий иммунный ответ, в отличие от сопоставимой вакцины для внутримышечных инъекций. В дальнейшей работе те же методы будут применены к другим серогруппам, чтобы дополнительно оценить, является ли этот способ доставки жизнеспособным вариантом.

Заключение

Разработка профилактических МВ затруднена из-за разнообразия антигенных вариантов *N. meningitidis* даже внутри серогруппы. Применение вакцин против одной или нескольких серогрупп или антигенных вариантов *N. meningitidis* может стимулировать замещение циркулирующего новым вариантом возбудителя, не входящим в состав вакцины. Такая смена разновидностей возбудителя менингита наблюдается и при естественном течении эпидемического процесса в случаях, когда в популяцию людей заносится новый вариант, не циркулирующий в данном регионе. Возникновение новых серогрупп менингококка наблюдалось, например, в «менингитном поясе», где после успешной вакцинации конъюгированной вакциной А возросла заболеваемость за счёт редко встречавшихся ранее серогрупп Х и С [4]. Существует и другой механизм замещения, известный как переключение капсул [29]. Это происходит между близкородственными вирулентными менингококковыми клонами в результате трансформации и горизонтального обмена генов [29]. Более 10 лет назад в Бразилии сообщалось о случаях переключения капсульного варианта В на вариант С [30]. В исследованиях штаммов *N. meningitidis* ST11СС, несущих серогруппы С или W₁₃₅ в Бразилии и серогруппы С и В в Испании, также была обнаружена картина сохранённой гиперинвазивности в появившихся штаммах W₁₃₅ и В [30].

Интересно отметить, что массовая иммунизация против менингококка серогруппы С в Англии, Испании, Италии не вызвала существенных изменений в серогрупповой структуре циркулирующей менингококковой популяции [4]. В связи с этим исследователи пришли к выводу о том, что появление новых серогрупп на основе циркулирующих инвазивных клонов после массовой вакцинации не имеет существенного значения, т.к. процесс изменения структуры популяции микроорганизмов происходит постоянно на одном и том же уровне, независимо от применяемых вакцин [4].

МВ, направленные к отдельным серогруппам, оказались эффективными в снижении бремени инвазивной МИ для общественного здравоохранения во многих регионах мира. Полисахаридные конъюгированные вакцины, а теперь и белковые/ВНМ вакцины направлены на большинство инвазивных серогрупп менингококка.

Разработка новых, в том числе современных белковых МВ, особенно актуальна для серогруппы В, т.к. из-за риска развития аутоиммунных реакций невозможно применение полисахаридных вакцин. Дальнейшая работа по совершенствованию белковых вакцин связана с использованием современного технологического подхода «обратной вакцинации» и направлена на обнаружение целевых белков с широким охватом клинически значимых штаммов. В качестве новых мишеней для МВ широкого профиля исследуются также липоолигосахариды и ВНМ [2].

Перспективным направлением является получение химически синтезированных полисахаридных антигенов, для которых можно лучше определить взаимосвязь между структурой полисахаридного антигена и иммуногенностью. Однако в настоящее время в обращении имеется только одна вакцина — для профилактики гемофильной инфекции, содержащая полностью синтетический углеводный антиген [2].

Создание синтетических МВ затрудняется из-за особенностей структуры капсульных полисахаридов и сложности их химического или химико-ферментативного воспроизведения. Ферментативные методы получения О-ацетилированных полисахаридов требуют рекомбинантного производства соответствующих О-ацетилтрансфераз и ферментов, продуцирующих капсулы [2]. Получение синтетических полисахаридных антигенов представляет собой трудоёмкий процесс, включающий синтез олигомеров различной длины, прикрепление их к белку-носителю и оценку генерируемого иммунного ответа. Определённые успехи были достигнуты в применении для синтеза полисахаридов технологии углеводных микроматриц [2]. Микроматрицы могут значительно упростить процесс, поскольку дают возможность тестировать специфическую активность полученных полисахаридов в высокопроизводительном формате на планшете с микрочипами с использованием панели клинически значимых серогрупп-специфических антигенов [2].

Белки-носители также являются важными компонентами вакцин. В недавних исследованиях изучались новые белки-носители для производства вакцин-кандидатов: адгезивный белок АСР, усечённый вариант адгезина NhhA, нейссерияльный поверхностный протеин NspA, связывающий фактор Н и индуцирующий бактерицидные антитела, встречающийся у большинства штаммов [2, 4]. Вместе с тем новые белки потребуют значи-

тельного количества лабораторных и клинических исследований для установления их безопасности и эффективности перед использованием в конъюгированных вакцинах. Наиболее актуальной является разработка вакцины против *N. meningitidis* серогруппы X, поскольку распространённость этой серогруппы увеличивается [2].

Не теряет своей актуальности и разработка единой вакцины против всех серогрупп менингококка, а не его отдельных разновидностей. Одной из попыток решения этого вопроса явилось создание полигрупповой вакцины против серогрупп А, В, С, Y, W₁₃₅ с использованием имеющихся монопрепаратов. Проведение II фазы слепого рандомизированного контролируемого исследования выявило высокую иммунологическую эффективность, низкую реактогенность и безопасность этого смешанного препарата [4].

Таким образом, стратегии вакцинации против МИ включают полисахаридные, конъюгированные, комбинированные конъюгированные вакцины и вакцины на основе рекомбинантного белка/ВНМ. В многочисленных исследованиях убедительно доказано, что эти вакцины безопасны и эффективны против *N. meningitidis* серогрупп А, В, С, W и Y.

Подводя итог вышеизложенному, можно сделать заключение о том, что в современных условиях с развитием технологий в области создания полисахаридных конъюгированных вакцин будущего открываются новые возможности использования таких подходов, как химический/химико-ферментный синтез, улучшенная характеристика белка-носителя и сайт-специфическая конъюгация. Данные подходы уже реализуются при разработке конъюгированной вакцины против *N. meningitidis* серогруппы X, для которой в настоящее время нет защитной вакцины.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Berti F., Romano M.R., Micoli F., Adamo R. Carbohydrate based meningococcal vaccines: past and present overview. *Glycoconj. J.* 2021;38(4):401–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10719-021-09990-y>
2. McCarthy P.C., Sharyan A., Sheikhi Moghaddam L. Meningococcal vaccines: current status and emerging strategies. *Vaccines (Basel)*. 2018;6(1):12. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines6010012>
3. Borrow R., Alarcón P., Carlos J., et al. The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection. *Expert Rev. Vaccines*. 2017;16(4):313–28. DOI: <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1258308>
4. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. Современные менингококковые вакцины: сильные и слабые стороны, ближайшие перспективы. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15(4):64–73. Kostyukova N.N., Bekhalo V.A. Current meningococcal vaccines: advantages and disadvantages and new challenges. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(4):64–73. EDN: <https://elibrary.ru/wirhwd>
5. Абрамцева М.В., Тарасов А.П., Немировская Т.И. Менингококковая инфекция. Полисахаридные менингококковые

- вакцины. Исторические аспекты и современное состояние разработок. Сообщение 2. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2015;(3):25–33. Abramtseva M.V., Tarasov A.P., Nemirovskaya T.I. Meningococcal disease. Polysaccharide meningococcal vaccines. The historical aspects and the current state of vaccine development. Report 2. *Biopreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2015;(3):25–33. EDN: <https://elibrary.ru/sivkha>
6. Tontini M., Romano M.R., Proietti D., et al. Preclinical studies on new proteins as carrier for glycoconjugate vaccines. *Vaccine*. 2016;34(35):4235–42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.039>
 7. Gasparini R., Panatto D. Meningococcal glycoconjugate vaccines. *Hum. Vaccin*. 2011;7(2):170–82. DOI: <https://doi.org/10.4161/hv.7.2.13717>
 8. LaForce F.M., Djingarey M., Viviani S., Preziosi M.P. Lessons from the Meningitis Vaccine Project. *Virallmmunol*. 2018;31(2):109–13. DOI: <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0120>
 9. Dhillon S., Pace D. Meningococcal quadrivalent tetanus toxoid conjugate vaccine (MenACWY-TT; Nimenrix®): a review. *Drugs*. 2017;77(17):1881–96. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0828-8>
 10. Miller J.M., Mesaros N., Van Der Wielen M., Baine Y. Conjugate meningococcal vaccines development: GSK biologicals experience. *Adv. Prev. Med*. 2011;2011:846756. DOI: <https://doi.org/10.4061/2011/846756>
 11. Kulkarni H.M., Jagannadham M.V. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology (Reading)*. 2014;160(Pt. 10):2109–21. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.079400-0>
 12. Nadel S. Prospects for eradication of meningococcal disease. *Arch. Dis. Child*. 2012;97(11):993–8. DOI: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2012-302036>
 13. Gasparini R., Panatto D., Bragazzi N.L., et al. How the knowledge of interactions between meningococcus and the human immune system has been used to prepare effective *Neisseria meningitidis* vaccines. *J. Immunol. Res*. 2015;2015:189153. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/189153>
 14. de Kleijn E.D., de Groot R., Labadie J., et al. Immunogenicity and safety of a hexavalent meningococcal outer-membrane-vesicle vaccine in children of 2–3 and 7–8 years of age. *Vaccine*. 2000;18(15):1456–66. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00423-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00423-5)
 15. Tan L.K., Carlone G.M., Borrow R. Advances in the development of vaccines against *Neisseria meningitidis*. *N. Engl. J. Med*. 2010;362(16):1511–20. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmra0906357>
 16. Bambini S., Piet J., Muzzi A., et al. An analysis of the sequence variability of meningococcal fHbp, NadA and NHBA over a 50-year period in the Netherlands. *PLoS One*. 2013;8(5):e65043. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065043>
 17. McIntosh E.D., Carey V., Toneatto D., et al. Prevention of rare diseases: how revolutionary techniques can help vulnerable individuals — the example of serogroup B meningococcal infection. *Ther. Adv. Vaccines*. 2015;3(1):13–23. DOI: <https://doi.org/10.1177/2051013614557477>
 18. Richmond P.C., Marshall H.S., Nissen M.D., et al. Safety, immunogenicity, and tolerability of meningococcal serogroup B bivalent recombinant lipoprotein 2086 vaccine in healthy adolescents: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect. Dis*. 2012;12(8):597–607. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(12\)70087-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(12)70087-7)
 19. Folaranmi T., Rubin L., Martin S.W., et al. Use of serogroup B meningococcal vaccines in persons aged ≥ 10 years at increased risk for serogroup B meningococcal disease: recommendations of the advisory committee on immunization practices, 2015. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep*. 2015;64(22):608–12.
 20. Frasch C.E. Preparation of bacterial polysaccharide-protein conjugates: analytical and manufacturing challenges. *Vaccine*. 2009;27(46):6468–70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.013>
 21. Gao Q., Zaccaria C., Tontini M., et al. Synthesis and preliminary biological evaluation of carba analogues from *Neisseria meningitidis* A capsular polysaccharide. *Org. Biomol. Chem*. 2012;10(33):6673–81. DOI: <https://doi.org/10.1039/c2ob25222h>
 22. Wang C.H., Li S.T., Lin T.L., et al. Synthesis of *Neisseria meningitidis* serogroup W135 capsular oligosaccharides for immunogenicity comparison and vaccine development. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 2013;52(35):9157–61. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201302540>
 23. Harale K.R., Rout J.K., Chhikara M.K., et al. Synthesis and immunochemical evaluation of a novel *Neisseria meningitidis* serogroup A tetrasaccharide and its conjugate. *Org. Chem. Front*. 2017;4(12):2348–57. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7QO00468K>
 24. Mosley S.L., Rancy P.C., Peterson D.C., et al. Chemoenzymatic synthesis of conjugatable oligosialic acids. *Biocatal. Biotransformation*. 2010;28(1):41–50. DOI: <https://doi.org/10.3109/10242420903388694>
 25. McCarthy P.C., Saksena R., Peterson D.C., et al. Chemoenzymatic synthesis of immunogenic meningococcal group C polysialic acid-tetanus Hc fragment glycoconjugates. *Glycoconj. J*. 2013;30(9):857–70. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10719-013-9490-x>
 26. Fiebig T., Litschko C., Freiberger F., et al. Efficient solid-phase synthesis of meningococcal capsular oligosaccharides enables simple and fast chemoenzymatic vaccine production. *J. Biol. Chem*. 2018;293(3):953–62. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.ra117.000488>
 27. Del Tordello E., Danilchanka O., McCluskey A.J., Mekalanos J.J. Type VI secretion system sheaths as nanoparticles for antigen display. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2016;113(11):3042–7. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1524290113>
 28. Donadei A., Balocchi C., Romano M.R., et al. Optimizing adjuvants for intradermal delivery of MenC glycoconjugate vaccine. *Vaccine*. 2017;35(32):3930–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.018>
 29. Swartley J.S., Marfin A.A., Edupuganti S., et al. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1997;94(1):271–6. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.1.271>
 30. Castiñeiras T.M., Barroso D.E., Marsh J.W., et al. Capsular switching in invasive *Neisseria meningitidis*, Brazil(1). *Emerg. Infect. Dis*. 2012;18(8):1336–8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1808.111344>

Информация об авторах

Савкина Мария Владимировна[✉] — к.б.н., главный эксперт Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия, savkina@expmed.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8527-2157>

Саяпина Лидия Васильевна — д.м.н., главный эксперт Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2272-2621>

Кривых Максим Андреевич — к.фарм.н., зам. начальника управления по экспертизе противобактериальных медицинских иммунобиологических препаратов Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2003-1264>

Обухов Юрий Иванович — начальник управления по экспертизе противобактериальных медицинских иммунобиологических препаратов Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7729-9800>

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 23.05.2023;
принята к публикации 25.07.2023;
опубликована 28.08.2023

Information about the authors

Maria V. Savkina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), chief expert, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia, savkina@expmed.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8527-2157>

Lidiya V. Sayapina — D. Sci. (Med.), chief expert, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2272-2621>

Maxim A. Krivykh — Cand. Sci. (Pharm.), Deputy Head, Department for expertise of antibacterial medical immunobiological preparations, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2003-1264>

Yury I. Obukhov — Head, Department for expertise of antibacterial medical immunobiological preparations, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7729-9800>

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 23.05.2023;
accepted for publication 25.07.2023;
published 28.08.2023

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-332>

Видовая характеристика бактерий рода *Lactobacillus*, циркулирующих в различных локусах организма человека (обзор литературы)

Ташланова В.В., Катаева Л.В.[✉], Степанова Т.Ф.

Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, Тюмень, Россия

Аннотация

Бактерии рода *Lactobacillus* — это обитатели поверхностей слизистых оболочек человека: ротовой полости, пищеварительного и урогенитального тракта; они обнаруживаются также в грудном молоке и мокроте. Ввиду многочисленных генетических различий, метаболических способностей и других функций видов, включённых в этот род, в 2020 г. предложено пересмотреть классификацию рода *Lactobacillus*. В последнее время в научной медицинской литературе активно обсуждаются вопросы влияния лактобактерий на микробиом человека, поддержание здоровья и предупреждение патологических состояний организма. Настоящий обзор посвящён функциональным характеристикам и анализу видового разнообразия *Lactobacillus* spp., циркулирующих в различных системах организма, участию их в формировании и регуляции защитных механизмов. Вместе с тем отмечаются и негативные воздействия, связанные чаще всего с передачей генетических детерминант резистентности к антимикробным препаратам от лактобацилл к грамотрицательной микробиоте.

Ключевые слова: роль лактобацилл, *Lactobacillus* spp., желудочно-кишечный тракт, урогенитальный тракт, респираторный тракт, грудное молоко

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках НИР № АААА-А20-1200109990062-4.

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

Для цитирования: Ташланова В.В., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф. Видовая характеристика бактерий рода *Lactobacillus*, циркулирующих в различных локусах организма человека (обзор литературы). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):364–375.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-332>. EDN: <https://www.elibrary.ru/sbyxkc>

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-332>

Species characteristics of bacteria of the genus *Lactobacillus* identified in different loci of the human body (literature review)

Victoriya V. Tashlanova, Lyubov V. Kataeva[✉], Tatyana F. Stepanova

Tyumen Region Infection Pathology Research Institute Tyumen, Russia

Abstract

Bacteria of the genus *Lactobacillus* are inhabitants of the surfaces of human mucous membranes, such as the oral cavity, digestive and urogenital tracts. Moreover, there is evidence that they are found in breast milk and sputum. In view of the many genetic differences, metabolic abilities and other functions of the species included in this genus, a revision of the classification of the genus *Lactobacillus* is proposed in 2020. Recently, in the scientific medical literature, the issues related to the influence of lactobacilli on the human microbiome, maintaining health and preventing pathological conditions of the body have been actively discussed. This review is devoted to the functional characteristics and analysis of the species diversity of *Lactobacillus* spp. circulating in various body systems, their participation in the formation and regulation of defense mechanisms. However, negative impacts

are also noted, most often associated with the transfer of genetic determinants of resistance to antimicrobial drugs from lactobacilli to gram-negative microbiota.

Keywords: role of lactobacilli, *Lactobacillus* spp., gastrointestinal tract, urogenital tract, respiratory tract, breast milk

Funding source. The study was supported by budget financing within the framework of research work No. AAA-A-20-1200109990062-4.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Tashlanova V.V., Kataeva L.V., Stepanova T.F. Species characteristics of bacteria of the genus *Lactobacillus* identified in different loci of the human body (literature review). *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(4):364–375.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-332>. EDN: <https://www.elibrary.ru/sbyxkc>

Введение

Lactobacillaceae является единственным семейством молочнокислых бактерий, которое включает гомоферментативные и гетероферментативные микроорганизмы; оно одно из самых многочисленных по видовому многообразию. Род *Lactobacillus* принадлежит к типу *Bacillota*, классу *Bacilli*, отряду *Lactobacillales*. Среди многих других микроорганизмов М. Beijerinck в 1901 г. выделил молочнокислые бактерии [1]. Бактерии рода *Lactobacillus* — это грамположительные, неспорообразующие палочки с закруглёнными концами, формирующие короткие цепочки или расположенные поодиночке, характеризующиеся выраженным полиморфизмом¹. Многие виды относят к факультативно-анаэробным микроорганизмам, некоторые — к микроаэрофилам, преимущественно неподвижным (за исключением *L. ruminis*) [2, 3].

Применение генотипического и филогенетического анализов, секвенирования генов *16S* рибосомальную РНК (рРНК) позволило пополнить род *Lactobacillus* многими видами, количество которых на март 2020 г. составило 261. В связи с вновь открывшимися данными было предложено провести реклассификацию рода *Lactobacillus* в 25 родов и добавить 23 новых [4].

По типу потребляемого субстрата лактобактерии (ЛБ) относят к сахаролитической микробиоте. Метаболиты ЛБ поддерживают гомеостаз и купируют негативное влияние патогенной флоры [5]. ЛБ представляют собой важную составляющую микробиоты человека, отвечающую за ряд главных функций. Одной из них является проявление антагонистической активности в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов, кроме того, возможно межвидовое соперничество в занимаемой нише. ЛБ активируют иммунную систему, проявляют антиоксидантную активность, благодаря выработке бактериоцинов участвуют в модуляции

микробиоты. Жизнедеятельность ЛБ приводит к нормализации метаболических нарушений в организме человека [6, 7].

За счёт способности к образованию молочной кислоты, перекиси водорода, производству белка лизоцима, ЛБ приобретают антибактериальную и противовирусную активность. При достижении кислотности окружающей среды обитания 5,0–5,6 усиливается выработка веществ с бактериостатическими и бактерицидными свойствами, таких как реутерин, плантарицин, лактоцидин, лактолин¹ [8]. Снижение количества ЛБ приводит к уменьшению синтеза фермента гистаминазы, вследствие чего повышается уровень гистамина, избыток которого приводит к развитию патологических процессов в организме [9]. Некоторые штаммы ЛБ продуцируют уреазу наравне с *Clostridium perfringens*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp. и др. [10]. Исследования антибиотикорезистентности ЛБ свидетельствуют о том, что существует природная резистентность к аминогликозидам, ципрофлоксацину, ванкомицину и цефалоспорином [11].

Цель настоящего обзора — обобщение данных функциональных характеристик *Lactobacillus* spp. и анализ видового состава бактерий в различных локусах организма человека.

Основная часть

Одним из основных мест обитания ЛБ служит **желудочно-кишечный тракт (ЖКТ)** — от ротовой полости до толстой кишки. ЛБ в процессе своей жизнедеятельности создают и поддерживают благоприятное функционирование слизистых оболочек, обеспечивая способность к секреции, формированию защитных, барьерных свойств, поддержанию целостности гликокаликса. При развитии воспалительного процесса в ЖКТ нарушается целостность защитного слоя слизистой оболочки, в результате чего патогенные, условно-патогенные бактерии и комменсалы могут беспрепятственно преодолевать этот барьер [5].

¹ Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». М.; 2004. 127 с.

При появлении на свет и всю продолжительность жизни человека происходит активное формирование и поддержание иммунной системы за счёт постоянно видоизменяющейся кишечной микрофлоры, в составе которой присутствуют ЛБ [12]. Содержание их в норме в ротовой полости составляет 10^3 КОЕ/мл. Среди отобранных образцов слюны отмечена вариация концентрации *Lactobacillus* spp., наивысший показатель достигает 10^7 КОЕ/мл [15]. Содержание ЛБ в слюне здоровых людей в возрасте 25–30 лет колеблется от 2,3 до 3,3 lg КОЕ/мл, в желудочном содержимом — 10^2 – 10^3 КОЕ/см³, в кишечном соке тонкой кишки — до 10^{10} КОЕ/мл, в тощей и подвздошной кишках — 2–5 lg КОЕ/мл, в содержимом толстой кишки — 10^6 – 10^8 КОЕ/г [6, 13–15].

Метаболический потенциал ЛБ приводит к подкислению среды обитания и при достижении концентрации 10^5 КОЕ/мл в слюне может способствовать развитию заболеваний полости рта, например кариесу [16]. Виды ЛБ, циркулирующих в различных локусах ЖКТ, представлены в табл. 1.

Таким образом, наибольшее видовое разнообразие *Lactobacillus* spp., циркулирующих в ЖКТ, отмечается в слюне, ротовой полости и содержимом толстой кишки (20 и 19 видов соответственно). Слюна и слизистая ротовой полости характеризовались определением редких видов: *L. alactosus*,

L. cellobiosus, *L. buchneri*, *L. pentosus*, *L. xylosus*, *L. oris*, *L. leichmanii*. Содержимое желудка и тонкой кишки отличалось более скудным видовым разнообразием и представлено *L. gastricus*, *L. antri*, *L. kalixensis*, *L. ultenensis*. Во всех исследованных локусах ЖКТ регистрировалось обнаружение *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*.

Микробиота респираторного тракта (верхних и нижних дыхательных путей) имеет различия по качественному, количественному составу и зависит от многочисленных факторов: состояния иммунной системы, возраста, сопутствующих заболеваний, географического положения, употребления табака и его производных. Микробиота организма человека принимает активное участие в регуляции восприимчивости к респираторным инфекциям. Ранее считалось, что нижние дыхательные пути и лёгкие стерильны, однако благодаря идентификации методом полимеразной цепной реакции с помощью гена, кодирующего *16S* рРНК, оказалось возможным доказать обратное. Подтверждено, что бактерии всё же присутствуют в тканях лёгких здоровых людей, но только в малых концентрациях по сравнению с отделами верхних дыхательных путей. Поскольку бактериальное сообщество здоровых тканей лёгких имеет состав, аналогичный составу ротовой полости, можно предположить, что происходит транслокация внутри микробного сообщества [20].

Таблица 1. Видовое разнообразие ЛБ, циркулирующих в различных локусах ЖКТ

Table 1. Species diversity of bacteria of the genus *Lactobacillus* identified in different loci of the gastrointestinal tract

Локализация Localization	Год публикации Year of publication	Вид Type
Слюна, ротовая полость Saliva, oral cavity	2006, 2008, 2010, 2019	<i>L. gasseri</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. vaginalis</i> [15–18]
	2008, 2017, 2019	<i>L. casei</i> [13, 16, 17]
	2008	<i>L. crispatus</i> [17]
	2008, 2010, 2017, 2019	<i>L. fermentum</i> [13, 16–18]
	2008, 2010	<i>L. plantarum</i> [17, 18]
	2008, 2017	<i>L. acidophilus</i> [13, 17]
	2008	<i>L. alactosus</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. xylosus</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. leichmanii</i> [17]
Содержимое желудка Stomach contents	2017	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> [13]
	2010	<i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. ruminis</i> [18]
	2017	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> [13]
Тонкая кишка Small intestine	2017	<i>L. gastricus</i> , <i>L. antri</i> , <i>L. kalixensis</i> , <i>L. ultenensis</i> [14]
	2010	<i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> [18]
	2017	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. salivarius</i> [13]
Толстая кишка (фекалии) Large intestine (feces)	2010, 2019	<i>L. gasseri</i> , <i>L. paracasei</i> [18, 19]
	2010	<i>L. ruminis</i> [18]
	2010, 2019	<i>L. reuteri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. sakei</i> [18, 19]
	2019	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. mucosae</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. agilis</i> , <i>L. ohnsonii</i> , <i>L. antri</i> [19]

Слизистые верхних дыхательных путей служат входными воротами респираторного тракта [21, 22], одним из представителей колонизируемой микробиоты являются бактерии рода *Lactobacillus* [6]. Нормобиота слизистой носа и зева осуществляет комплекс физико-биохимических процессов, вырабатывая необходимые вещества, которые идут на поддержание благоприятной среды. Складывается положительный эффект, влияющий на защитную функцию, задачей которой является предотвращение контаминации и дальнейшей колонизации патогенными бактериями слизистых оболочек. От состава микробиоты, заложенной или приобретённой при рождении, зависит дальнейшее течение заболеваний дыхательной системы. ЛБ, колонизирующие верхние дыхательные пути новорождённого, отвечают за формирование иммунитета [20].

При рождении микробный пейзаж слизистой оболочки носа и носоглотки новорождённого представлен бактериями родов *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Dolosigranulum*, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*. С момента рождения и на протяжении жизни микробиота слизистых респираторного тракта подвержена периодической изменчивости под влиянием в первую очередь факторов внешней среды, включая возбудителей бактериальных и вирусных инфекций. Нарушение баланса факторов поддержки микробиома возникает и по причине индивидуальных особенностей организма. Несмотря на ряд защитных факторов, вырабатываемых бокаловидными клетками эпителия слизистой верхних дыхательных путей, отмечена адаптация ЛБ к колонизации носоглотки [21, 22]. Разнообразие ЛБ, выделенных со слизистых оболочек и содержимого респираторного тракта, представлено в **табл. 2**.

Таким образом, данные литературы свидетельствуют о том, что все локусы респираторного тракта

человека также заселены ЛБ. Слизистые оболочки верхних дыхательных путей отличаются большим видовым разнообразием ЛБ, указываются следующие виды: *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei/paracasei*, *L. salivarius*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. iners*, *L. sakei*. Имеются единичные исследования биоптата лёгких и жидкости плевральной полости, в которых отмечается скудный состав ЛБ, представленный видами *L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *L. gasseri*. Важно подчеркнуть, что эти три вида *Lactobacillus* регистрировались во всех локусах респираторного тракта.

Видовая характеристика состава ЛБ **урогенитального тракта женщин** также зависит от нескольких специфических факторов: фаз менструального цикла, гормонального фона, контрацепции, особенностей гигиены, расовой принадлежности. Микробиота влагалища представлена анаэробными и аэробными бактериями [30, 31]. Основное место в её структуре занимают ЛБ, на долю которых приходится 90–98% от общего состава микроорганизмов, содержащихся в слизистом отделяемом. Самыми распространёнными среди видового состава являются *L. crispatus*, *L. iners*, *L. acidophilus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. vaginalis*, *L. delbrueckii* [13, 32–37].

Под действием гормона эстрогена совершается созревание клеток поверхностного эпителия слизистого слоя влагалища, содержащего гликоген. При постоянном смывании и обновлении клеток происходит выход гликогена, обеспечивающего благоприятную среду для жизнедеятельности ЛБ [13, 35]. В процессе жизнедеятельности ЛБ вырабатывают молочную кислоту, перекись водорода и бактериоцины, обеспечивая колонизационную резистентность вагинальной слизистой, предотвращая размножение патогенных микроорганизмов и стимулируя местный иммунитет [35, 38]. Молочная кислота — это основа защиты влагалищной среды. Даже при её незначительном количестве

Таблица 2. Видовое разнообразие ЛБ, циркулирующих в различных локусах респираторного тракта
Table 2. Species diversity of bacteria of the genus *Lactobacillus* identified in different loci of the respiratory tract

Локализация Localization	Год публикации Year of publication	Вид Type
Нос, зев Nose, pharynx	2007, 2019	<i>Lactobacillus</i> spp. [23, 24]
	2010	<i>L. gasseri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei/paracasei</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. acidophilus</i> [18]
	2020	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> [21]
Мокрота Sputum	2013	<i>Lactobacillus</i> spp. [25]
	2021	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. coryneformis</i> [26]
Биоптат лёгких Lung biopsy	2016	<i>L. fermentum</i> [27]
Плевральная полость Pleural cavity	2016	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. gasseri</i> [28]
	2017	<i>L. gasseri</i> [29]

кислотность во влагалище поддерживается на уровне pH 3,8–4,2 [39]. Соотношение L- и D-изомеров молочной кислоты на фоне бактериальных вагинитов может варьироваться [32]. Присутствие L- и D-изомеров в одинаковой концентрации характеризует наличие ЛБ, в то же время при изменении микробного пейзажа уровень L-изомеров повышается. Концентрация D-лактата во влагалищной среде служит маркером состояния и стабильности экосистемы. Нарушение качественного и количественного соотношения вагинальной микробиоты приводит к снижению численности ЛБ, вследствие чего развивается воспалительный процесс [36, 37, 40, 41].

Одним из очень важных свойств ЛБ является способность к выработке перекиси водорода. Исследование вагинальных ЛБ свидетельствует о том, что наиболее часто встречающиеся *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. vaginalis* относятся к перекись-продуцирующим видам, отсутствие которых во влагалищном содержимом связывают с увеличением частоты бактериального вагиноза [35]. Кроме того, обнаружение большого количества *L. crispatus* коррелирует с низким уровнем pH вагинального отделяемого [37]. Доминирование *L. crispatus* выступает значимым прогностическим параметром вагинального здоровья и индикатором нормоценоза. Преобладающее присутствие *L. iners* сигнализирует о нарушениях вагинального биоценоза. Значение *L. jensenii* и *L. gasseri*, а также других нередко встречающихся видов остаётся неясным [34].

Видовое разнообразие бактерий в норме и при патологии может варьировать. Так *L. gasseri* чаще обнаруживается в моче при инфекциях мочевыводительных путей и указывает на риск развития бактериального вагиноза, а также преждевременных родов. Обнаружение *L. crispatus* свидетельствует о доминирующей способности их протективных свойств, обеспечивающих поддержание нормобиоты влагалищной среды женщин и защищающих от инфекций, передающихся половым путём [42].

Среди более распространённых видов микробиоты влагалища указываются *L. iners* и *L. gasseri*. Описанному в 1999 г. виду бактерий *L. iners*, приписывается участие в восстановлении вагинальной микробиоты и активизации врождённого иммунитета, хотя вопрос о роли обоих видов в поддержании здоровья женщин остаётся спорным [30, 43]. При невынашивании беременности на раннем сроке по результатам анализа микробиоты влагалища установлено доминирование *L. iners* [34]. Преобладание *L. iners*, особенно при отсутствии *L. crispatus*, является неблагоприятным признаком, свидетельствующим о высоком риске развития дисбиоза влагалища [37]. Изучение генома *L. iners* показало, что в его аминокислотных последовательностях присутствуют чужеродные гены, не характерные для семейства *Lactobacillaceae*, благодаря которым этот вид может

приспосабливаться к изменению окружающей среды и менять свой метаболизм, используя в качестве питания не гликоген, а другие вещества [35].

Нарушения нормоценоза влагалища приводят к различным гинекологическим заболеваниям: кольпиту, цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раку шейки матки. Однако связь между вагинальной микробиотой и раком шейки матки до конца не выяснена. Нарушение баланса ЛБ приводит к избыточному росту анаэробных патогенов, продуцирующих метаболиты, которые увеличивают риск развития инфекции вируса папилломы человека (ВПЧ). X. Yang и соавт. высказали мнение, что снижение количества ЛБ в сочетании с онкогенной инфекцией ВПЧ приводит к развитию рака шейки матки [44].

Поскольку видовая идентификация ЛБ имеет значение для определения нарушений микробиоты влагалищного содержимого женщин, выбор питательных сред для их выделения и культивирования должен осуществляться с учётом ростовых характеристик. При этом возникает вопрос об информативности отдельных методик исследования их видового состава. Традиционно считается, что «золотым стандартом» для идентификации бактерий является культуральное исследование. Однако применительно к вагинальным ЛБ ещё в 1980 г. была отмечена невозможность идентификации вида внутри комплекса *L. acidophilus* по биохимическим признакам. Вместе с тем было установлено, что часто выявляемый вид *L. iners* не культивируется на селективных для ЛБ питательных средах (лактобакагар, агар Рогоза, MRS агар). Для выделения *L. iners* было предложено использовать кровяной агар. В настоящее время для определения видов ЛБ в клиническом материале широко используется метод количественной полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени. Наборы позволяют идентифицировать и определить количество 7 видов ЛБ: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. vaginalis*, *L. johnsonii* [35, 37].

Микробиота урогенитального тракта мужчин, в частности эякулята, остаётся недостаточно изученной. Ранее эякулят здоровых мужчин считали в норме стерильной жидкостью, а обнаружение микроорганизмов при проведении бактериологического исследования ассоциировали с наличием патологии. Тем не менее недавние исследования демонстрируют наличие микробиоты в эякуляте, в том числе у пациентов без воспалительной патологии. Было показано, что микробиота эякулята представлена полимикробными сообществами представителей разных родов. По данным ряда авторов, ЛБ — одни из часто встречающихся микроорганизмов как у здоровых мужчин, так и у пациентов с уретритом или простатитом. ЛБ обнаруживаются в

9,0–73,3% случаев в микробиоте эякулята у мужчин с бесплодием. ЛБ выделялись у больных простатитом мужчин в меньшей степени, чем у пациентов без патологии. При ведении пациентов с репродуктивными нарушениями исследователями накоплен клинический опыт, демонстрирующий возможную взаимосвязь изменения уровня половых гормонов и основных показателей спермограммы с наличием ЛБ в эякуляте [45]. Одним из представителей микробиоты эякулята, выделяемых у здоровых мужчин в большом количестве, является *L. iners*. В литературе дискутируется вопрос о микробном сообществе эякулята, способствующем развитию патологии или являющимся нормой. Остаётся невыясненным вопрос о взаимовлиянии ассоциаций микробиоты урогенитального тракта и возможности приобретения патогенных свойств в течение жизнедеятельности [31, 39]. Известно, что ЛБ в сперме у здоровых мужчин позитивно влияют на подвижность и жизнеспособность сперматозоидов и оказывают положительное воздействие на влагалищную среду женщин [46].

На протяжении последних лет мочу считали стерильной жидкостью, обращая внимание главным образом на монокультуру бактерий, представленную узким кругом условно-патогенных бактерий. Идентифицированные с помощью культурального метода ЛБ считали нормой и при выдаче результата исследования игнорировались. Наличие в исследуемом материале разнообразного микробного сообщества говорило о загрязнении вегетирующей микробиотой при прохождении через мочеиспускательный канал.

Применение современных методов секвенирования генов микробиоты мочи позволяет идентифицировать всё видовое разнообразие, предположительно выполняющее защитную роль, при том что нарушение баланса микробиоценоза приводит к развитию инфекций [42].

Мочеполовая система мужчин и женщин анатомически устроена по-разному. Существует ряд схожих причин развития воспалительного процесса по восходящему пути: любое нарушение защитных механизмов, возрастные особенности, частая смена полового партнёра. У женщин, ко всему прочему, добавляются беременность, дисбаланс микробиоты влагалища, применение контрацептивов. Нарушения баланса микробиоты влагалища способствуют снижению защитных барьеров слизистой оболочки мочевого пузыря и влагалища, вследствие чего снижается концентрация молочной кислоты, поддерживающая кислотность мочи, что приводит к развитию воспалительного процесса. ЛБ обладают протективными свойствами, что даёт им преимущество в конкурентной борьбе с патогенными бактериями [42].

Микробиота мочи и влагалища здоровой женщины очень сходна при доминировании ЛБ [47], в то время как у здоровых мужчин моча по качественному составу бактерий напоминает кишечник и кожу с преобладанием бактерий *Corynebacterium* spp. [48]. ЛБ также описаны как представители мужской микробиоты, но в меньшей степени, чем у женщин. Остаётся спорным вопрос о происхождении микробного сообщества, в частности *Lactobacillus* spp., в системе мочевыводящих путей. Существуют две версии, рассматривающие источники попадания их в мочевыделительную систему и основанные на результатах исследования микробных популяций: по основной версии источником является влагалище, по другой — кишечник [49].

По наблюдениям авторов, развитие инфекции мочевыделительной системы происходит вследствие снижения количественного уровня популяций ЛБ и увеличения количества патогенов в моче. Например, *L. gasseri* чаще выделяются из мочевого пузыря женщин при воспалении [42]; *L. mulieris*, изолированные из катетеризованной мочи с рецидиви-

Таблица 3. Видовое разнообразие ЛБ, циркулирующих в различных локусах урогенитального тракта
Table 3. Species diversity of bacteria of the genus *Lactobacillus* identified in different loci of the urogenital tract

Локализация Localization	Год публикации Year of publication	Вид Type
Вагинальное содержимое Vaginal microbiota	2018	<i>L. crispatus</i> , <i>L. iners</i> [33, 37, 43]
		<i>L. gasseri</i> , <i>L. jensenii</i> [37, 43]
	2019, 2020 2021	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. cateniforme</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. coleohominis</i> [33]
		<i>L. johnsonii</i> , <i>L. vaginalis</i> [37] <i>Lactobacillus</i> spp. [39, 41]
Эякулят Ejaculate	2019, 2020	<i>L. iners</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. acidophilus</i> [52]
		<i>L. paracasei</i> , <i>L. jensenii</i> [36]
Моча Urine	2020	<i>L. gasseri</i> , <i>L. crispatus</i> [36, 52]
		<i>Lactobacillus</i> spp. [40, 46]
		<i>Lactobacillus</i> spp. [47, 51], <i>L. mulieris</i> [50]

рующей инфекцией мочевыделительной системы, выделяют биосурфактанты, при непосредственном участии которых происходит разрушение биоплёнки патогенов [50]. Установлена способность ЛБ к образованию агрегатов с *E. coli*, что расценивается как вариант симбиоза, в результате чего *E. coli* получают возможность выживать и размножаться [31]. Видовое разнообразие ЛБ, циркулирующих в локусах урогенитального тракта, представлено в **табл. 3**. ЛБ, колонизирующие урогенитальный тракт, представлены в основном видами *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* и *L. jensenii*. Из редких представителей выделяются *L. cateniforme*, *L. mulieris* и *L. coleohominis*.

Грудное молоко — это живая субстанция, жизненно необходимая младенцам в течение 1-го года жизни, которая является посредником для передачи потенциальных консорциумов пробиотических бактерий, включая *Lactobacillus*. В его составе содержатся важные питательные вещества: вода (87%), жиры (3,8%), белки (1,0%) и лактоза (7%) [53], а также биологически активные компоненты, выполняющие защитные и регуляторные функции [54]: гормоны, иммунные клетки, микроРНК, стволовые клетки [55], вирусы, бактерии и грибы. Наряду с микро- и макроэлементами в грудном молоке обнаруживаются разнообразные микроорганизмы, численность которых насчитывает до 600 видов, в 1 мл молока их количество достигает 10^3 – 10^4 КОЕ/мл [56]. Видовой состав бактерий зависит от метода идентификации. Так, использование только культурально-биохимического метода исследования, нацеленного на выделение потенциального патогена, выявляет скудный качественный состав — *Staphylococcus* spp. и представителей *Enterobacteriaceae*. ЛБ выделялись только при дополнительном введении в исследование питательных сред для культивирования бактерий в анаэробных условиях [53]. В эпоху использования анализов ампликона 16S рРНК и полногеномного секвенирования ДНК испытуемого образца здоровых женщин микробный пейзаж расширился, большую часть среди выделенных бактерий заняли *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Rothia*, *Cutibacterium*, *Veillonella* [53, 56]. Благодаря взаимодействию между бактериями, продуцирующими лактозу, и бактериями, которые её утилизируют, создаются оптимальные условия для поддержания гомеостаза внутренней системы. Количество изолятов *Lactobacillus* spp., содержащихся в 1 мл грудного молока, составляет 10^1 – 10^7 КОЕ/мл [57].

Происхождение бактерий *Lactobacillus* spp. в грудном молоке остаётся предметом обсужде-

ния. На данный момент существуют две теории о предполагаемой миграции ЛБ: 1) экзогенный путь (транслокация снаружи); 2) эндогенный (энтеромаммарный путь) [53, 55, 57]. Экзогенный путь подразумевает транслокацию бактерий через кожу соска, а именно млечные поры. Во время сосания и глотания ребёнком грудного молока происходит обмен микробиотой ротовой полости ребёнка, которую он первоначально получил из материнского репродуктивного тракта с микроорганизмами кожи матери. Установлено, что микробиота влагалища матери оказывает небольшое влияние на микробный состав материнского молока и детского кала, тогда как обнаружена корреляция между микробиомом молока и кала младенца [57].

Эндогенный путь предполагает транспорт бактерий из кишечника матери с непосредственным участием клеток иммунной системы DCS и CD18, включая макрофаги, которые при помощи фагоцитоза переносят до лимфатических узлов с последующей миграцией к альвеолярному эпителию молочных желёз и на слизистые органов урогенитального, дыхательного трактов [57]. Считается, что материнский кишечник является основным источником микробиоты кишечника младенца на стадии лактации. Перенос бактерий по эндогенному пути подтверждается сравнительным анализом микробиоты кала младенцев и грудного молока матерей. Выявлены 12 основных родов в объёме 70–88% общего числа бактерий, среди которых отмечены и ЛБ [53]. Подтверждение или опровержение каждой из теорий требует проведения дополнительных исследований. Важно определить механизмы передачи и присутствие в грудном молоке ЛБ и их влияние на микробиом в целом.

Согласно гипотезе Developmental Origins of Health and Disease (концепция «первопричин здоровья и болезней на ранних периодах развития»), которая первоначально была названа гипотезой Barker (1994), первичная микробиота кишечника младенца, приобретаемая при контакте с матерью и окружающей средой во время и после рождения, может влиять на его последующее здоровье — в первую очередь, на развитие таких заболеваний, как аллергия, сердечно-сосудистые заболевания, ожирение, диабет и неврологические расстройства в более позднем возрасте [58]. Результаты исследований видового разнообразия ЛБ, идентифицированных в грудном молоке, описанные в литературе, представлены в **табл. 4**.

Таким образом, поступающие с молоком матери микробные и иммунные факторы стимулируют иммунитет ребёнка, подвергая его постоянной антигенной нагрузке и защищая организм в целом от патогенных бактерий [12]. Учитывая, что идентифицировать ЛБ в грудном молоке начали сравнительно недавно, исследователи отмечают 9 раз-

Таблица 4. Видовое разнообразие ЛБ, циркулирующих в грудном молоке
Table 4. Species diversity of the genus *Lactobacillus* identified in breast milk

Локализация Localization	Год публикации Year of publication	Вид Type
Грудное молоко Breast milk	2011, 2012, 2014	<i>L. casei</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. gasseri</i> [59, 60]
	2015	<i>Lactobacillus</i> spp. [54]
	2017	<i>L. salivarius</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. acidophilus</i> [55]
	2018	<i>L. reuteri</i> [61]
	2019	<i>L. gasseri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i> [62]
	2020	<i>L. gasseri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> [57]

новидностей ЛБ, которые обнаруживаются также в урогенитальном, желудочно-кишечном трактах и других локусах организма.

Наряду с положительным влиянием на здоровье человека ЛБ способны выступать в роли патогена у людей с вторичными иммунодефицитами, ослабленным иммунитетом и быть причиной кариеса зубов, ревматических сосудистых заболеваний, абсцессов, бактериемии, эндокардита, лёгочных инфекций и неонатального менингита, сепсиса и пневмонии [2, 6, 26]. Среди ЛБ зарегистрированы возбудители: *L. casei* spp. *rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. lactis*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*. Негативное воздействие выявлено у детей с синдромом гиперлактоидемии при обнаружении в кишечнике *L. fermentum* и *L. buchneri*. Некоторые штаммы *L. buchneri* способны синтезировать гистамин, который может служить причиной пищевого токсикоза [6]. Развитие пищевой аллергии на гистамин объясняет такой фактор риска, как генетическая предрасположенность к хроническим заболеваниям ЖКТ. Слизистая ЖКТ, подверженная гиперпроницаемости макромолекул, усугубляет нарушение количественного и качественного соотношения микробиоты кишечника.

Среди ЛБ с нормальной ферментативной активностью и обладающих факторами патогенности регистрируются штаммы — носители генов антибиотикорезистентности и способные к передаче генной информации путём конъюгации. У пациентов с внебольничной пневмонией фиксируются случаи обнаружения в биоматериале штаммов *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. coryneformis* [26]. Описан случай аспирационной пневмонии у иммунодефицитной больной, связанный с выявлением устойчивого к антимикробным препаратам штамма *L. paracasei*. У пациента с плевропневмонией были идентифицированы *L. coryneformis* [63].

Высказывается предположение, что *Lactobacillus* spp. за счёт содержания в клеточной стенке высокого уровня пептидогликана и тейхоевых кислот обладают значительной адсорбционной

способностью, позволяющей им связывать на своей поверхности вещества, которые провоцируют развитие рака мочевыводящих путей (тяжёлые металлы, кадмий, пестициды) [51].

Результаты исследования ЛБ свидетельствуют о природной резистентности их к аминогликозидам, ципрофлоксацину, ванкомицину и цефалоспорином. Проведённые молекулярно-генетические исследования плазмидной и хромосомной ДНК выявили потенциально мобильные гены устойчивости к тетрациклину и эритромицину [11]. По данным других авторов, ЛБ проявляют чувствительность к пенициллину, ампициллину, канамицину, эритромицину, рифампицину и левомицетину, но устойчивы к полимиксину, гентамицину, неомицину и мономицину, тетрациклину, налидиксовой кислоте, ко-тримоксазолу, сульфаниламидным препаратам. В отличие от других видов, *L. acidophilus* обладает чувствительностью к ванкомицину и ристомиицину. Высказывается мнение, что они обладают плазмидной ДНК с малыми молекулярными массами (менее 5 МД), которые не способны к самостоятельному переносу генов резистентности [6]. Учитывая указанные факты, важно отметить перспективы изучения свойств ЛБ с учётом видовой характеристики на молекулярно-генетическом уровне, тем более штаммов, предложенных для пробиотических препаратов. Положительный потенциал влияния ЛБ на обменные и регуляторные процессы макроорганизма, известный в настоящее время, намного превышает их опосредованное негативное влияние.

Выводы

Участие ЛБ в жизнедеятельности организма многообразно. Они оказывают существенное влияние на процессы обмена веществ, участвуют в синтезе витаминов группы В, С, К, никотиновой и фолиевой кислот, биотина, вырабатывают аминокислоты, молочную, уксусную и другие органические кислоты, антибиотико- и гормоноподобные вещества, перекись водорода, некоторые виды продуцируют эндогенный лизоцим.

Биотопы организма человека, отличающиеся относительно сходными факторами среды, могут являться местом персистенции 15–20 видов ЛБ. Среди всей совокупности видового разнообразия бактерий одного биотопа абсолютное количество их колеблется в широком диапазоне и, безусловно, зависит от анатомических особенностей слизистых оболочек и функциональных свойств.

Сравнительная характеристика видового многообразия ЛБ, персистирующих на слизистых ЖКТ, респираторного и урогенитального трактов, свидетельствует об их доминировании в биотопах ЖКТ, причём верхних и нижних отделов. Локусы респираторного тракта отличаются скудным количеством видов.

Нарушение видового состава ЛБ на слизистых различных биотопов организма и изменение их количества приводит к увеличению содержания патогенов, способствующих развитию воспалительных процессов. Поэтому бактериологическое исследование образцов биоматериала на выявление ЛБ помогает не только определить нарушение микробиоценоза различных экониш, но и предотвратить развитие бактериальных инфекций.

Негативные воздействия ЛБ на организм человека, описанные в немногочисленных научных публикациях, чаще всего имеют отношение к иммунокомпрометированным пациентам. Вместе с тем выделение каких-либо видов ЛБ при различных патологических процессах не доказывает их этиологической значимости в возникновении заболевания.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Salveti E., Torriani S., Zheng J., et al. Lactic acid bacteria: taxonomy and biodiversity. In: McSweeney P.L.H., Mc-Namara J.P., eds. *Encyclopedia of Dairy Sciences. Volume 4*. Elsevier; 2022:263–74. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00050-7>
- Zafar H., Saier M.H. Jr. Comparative genomics of the transport proteins of ten *Lactobacillus* strains. *Genes (Basel)*. 2020;11(10):1234. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11101234>
- Бородовицина С.И. *Кариез и некариозные поражения твердых тканей зуба*. Рязань; 2019. Borodovitsina S.I. *Caries and non-cariou lesions of hard tooth tissues*. Ryazan'; 2019.
- Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genus, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020;70(4):2782–858. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Fernández-Tomé S., Ortega Moreno L., Chaparro M., Gisbert J.P. Gut microbiota and dietary factors as modulators of the mucus layer in inflammatory bowel disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(19):10224. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms221910224>
- Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл. *Бюллетень сибирской медицины*. 2003;2(4):50–8. Glushanova N.A. Biological properties of lactobacillus. *The Bulletin of the Siberian Medicine*. 2003;2(4):50–8. DOI: <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2003-4-50-58> EDN: <https://elibrary.ru/sfzlap>
- Bai L., Kumar S., Verma S., Seshadri S. Bacteriocin PJ4 from probiotic *Lactobacillus* reduced adipokine and inflammasome in high fat diet induced obesity. *3 Biotech*. 2020;10(8):355. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02317-y>
- Бегунова А.В., Рожкова И.В., Ширшова Т.И. и др. Биосинтез антимикробных бактериоциноподобных соединений штаммом *Lactobacillus reuteri* LR1: оптимизация условий культивирования. *Биотехнология*. 2019;35(5):58–69. Begunova A.V., Rozhkova I.V., Shirshova T.I., et al. Biosynthesis of antimicrobial bacteriocin-like compounds by *Lactobacillus reuteri* LR1 strain: optimization of cultivation conditions. *Biotechnology*. 2019;35(5):58–69. DOI: <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-58-69> EDN: <https://elibrary.ru/uislwt>
- Циркин В.И., Хлыбова С.В. Роль гистамина в репродукции (обзор литературы). *Вятский медицинский вестник*. 2006;(3-4):62–7. Tsirkin V.I., Khlybova S.V. The role of histamine in reproduction (literature review). *The Medical Newsletter of Vyatka*. 2006;(3-4):62–7. EDN: <https://elibrary.ru/pbpodv>
- Mora D., Arioli S. Microbial urease in health and disease. *PLOS Pathog*. 2014;10(12):e1004472. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004472>
- Анисимова Е.А. *Антибиотикорезистентность лактобацилл: генетические детерминанты и возможные пути их распространения в кишечном микробиоме*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Казань; 2021. Anisimova E.A. *Antibiotic resistance of lactobacilli: genetic determinants and possible ways of their spread in the intestinal microbiome*: Diss. Kazan'; 2021.
- Скидан И.Н., Гуляев А.Е., Бельмер С.В. Пребиотические компоненты грудного молока и возможность повторения их эффектов в формулах детского питания. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2019;64(3):37–50. Skidan I.N., Gulyaev A.E., Bel'mer S.V. Prebiotic components of breast milk and the possibility of repeating their effects in infant formulas. *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*. 2019;64(3):37–50. DOI: <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2019-64-3-37-50> EDN: <https://elibrary.ru/ffxyzi>
- Ирkitова А.Н., Мацюра А.В. Эколого-биологическая характеристика *Lactobacillus acidophilus*. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2017;7(4):214–30. Irkitova A.N., Matsyura A.V. Ecological and biological characteristics of *Lactobacillus acidophilus*. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2017;7(4):214–30. DOI: https://doi.org/10.15421/2017_109
- Бовбель И.Э. Современные представления о микробиоте кишечника и возможности эффективного применения пробиотиков в практике врача-педиатра. *Медицинские новости*. 2017;(2):25–31. Bovbel' I.E. Intestinal microbiota and use of probiotics in pediatric practice. *Medical News*. 2017;(2):25–31. EDN: <https://elibrary.ru/xyeybn>
- Dal Bello F., Hertel C. Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli. *Syst. Appl. Microbiol.* 2006;29(1):69–76. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.002>
- Ahirwar S.S., Gupta M.K., Snehi S.K. Dental caries and *Lactobacillus*: role and ecology in the oral cavity. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2019;10(11):4818–29. DOI: [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(11\).4818-29](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(11).4818-29)
- Badet C., Thebaud N.B. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol. J.* 2008;(2):38–48. DOI: <https://doi.org/10.2174/1874285800802010038>
- GUPEA. Lönnemark E. Lactobacilli in the normal microbiota and probiotic effects of *Lactobacillus plantarum*; 2010. Available at: <http://hdl.handle.net/2077/21480>
- Катаева Л.В., Вакарина А.А., Колотова О.Н. и др. Возрастные особенности видового разнообразия лактобацилл толстого кишечника у жителей Тюмени. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2019;(3):10–5. Kataeva L.V., Vakarina A.A., Kolotova O.N., et al. Age features

- of species diversity lactobacilli of large intestine in residents of Tyumen. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;(3):10–5.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-3-10-15>
EDN: <https://elibrary.ru/ibboti>
20. Khan A.A., Singh H., Bilal M., Ashraf M.T. Microbiota, probiotics and respiratory infections: the three musketeers can tip off potential management of COVID-19. *Am. J. Transl. Res.* 2021;13(10):10977–93.
21. De Boeck I., van den Broek M.F.L., Allonsius C.N., et al. *Lactobacilli* have a niche in the human nose. *Cell Rep.* 2020;31(8):107674. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107674>
22. Лопатин А.С., Азизов И.С., Козлов Р.С. Микробиом полости носа и околоносовых пазух в норме и при патологии. Часть I. *Российская ринология*. 2021;29(1):23–30. Lopatin A.S., Azizov I.S., Kozlov R.S. Microbiome of the nasal cavity and the paranasal sinuses in health and disease (literature review). Part I. *Russian Rhinology*. 2021;29(1):23–30.
DOI: <https://doi.org/10.17116/rosrino20212901123>
EDN: <https://elibrary.ru/xdzdkb>
23. Захаров А.А., Ильина Н.А. Анализ микрофлоры ротовой полости обследованных людей с различными заболеваниями. *Успехи современного естествознания*. 2007;(12):353–5. Zakharov A.A., Il'ina N.A. Analysis of the oral microflora of examined people with various diseases. *Advances in Current Natural Sciences*. 2007;(12):353–5.
EDN: <https://elibrary.ru/ijmauf>
24. Рыжова Н.Н., Воронина Э.В., Лосева Е.И. и др. Микробиом респираторного тракта детей с муковисцидозом. *Сибирское медицинское обозрение*. 2019;(2):19–28. Ryzhova N.N., Voronina E.V., Loseva E.I., et al. Respiratory tract microbiome in children with cystic fibrosis. *Siberian Medical Review*. 2019;(2):19–28. DOI: <https://doi.org/10.20333/2500136-2019-2-19-28>
EDN: <https://elibrary.ru/zinqhr>
25. Cheung M.K., Lam W.Y., Fung W.Y., et al. Sputum microbiota in tuberculosis as revealed by 16S rRNA pyrosequencing. *PLoS One*. 2013;8(1):e54574.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054574>
26. Вечерковская М.Ф., Тец Г.В., Кардава К.М. и др. Типичные и нетипичные бактериальные возбудители заболеваний дыхательной системы. *Практическая пульмонология*. 2021;(1):87–96. Vecherkovskaya M.F., Tets G.V., Kardava K.M., et al. Typical and atypical bacterial pathogens of the respiratory system. *Practical Pulmonology*. 2021;(1):87–96.
EDN: <https://elibrary.ru/fqlwez>
27. Симбирцева А.С., Арутюнов Г.П., Джандарова Д.Т. и др. Сравнение микробиологического состава мокроты и биоптатов главных бронхов у пациентов с пневмонией на фоне декомпенсации хронической сердечной недостаточности. *Журнал Сердечная Недостаточность*. 2016;17(4):250–8. Simbirtseva A.S., Arutyunov G.P., Dzhandarova D.T., et al. Comparative microbiological composition of sputum and biopsy samples from major bronchi of patients with pneumonia associated with decompensated chronic heart failure. *Russian Heart Failure Journal*. 2016;17(4):250–8. DOI: <https://doi.org/10.18087/rhfj.2016.4.2268>. EDN: <https://elibrary.ru/wrkzgj>
28. Chaini E., Chaini N.D., Ioannidis A., et al. Pneumonia and pleural empyema due to a mixed *Lactobacillus* spp. infection as a possible early esophageal carcinoma signature. *Front. Med. (Lausanne)*. 2016;3:42.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2016.00042>
29. Esquibel A., Dababneh A.S., Palraj B.R. *Lactobacillus gasseri* causing bilateral empyema. *Case Rep. Infect. Dis.* 2017;2017:4895619.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/4895619>
30. Zheng N., Yao Y., Jin M., et al. *Lactobacillus iners* is associated with vaginal dysbiosis in healthy pregnant women: a preliminary study. *BioMed Res. Int.* 2019;2019:6079734.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/6079734>
31. Годовалов А.П., Гушин М.О., Карпунина Т.И. Особенности межмикробных отношений в микробиоте влагалища инфертильных женщин. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019;14(1-1):40–4. Godovalov A.P., Gushchin M.O., Karpunina T.I. Features of inter-microbial relations in the infer tile women's vagina microbiota. *Medical News of North Caucasus*. 2019;14(1-1):40–4.
DOI: <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14045>
EDN: <https://elibrary.ru/dwbhii>
32. Abdelmaksoud A.A., Koparde V.N., Sheth N.U., et al. Comparison of *Lactobacillus crispatus* isolates from *Lactobacillus*-dominated vaginal microbiomes with isolates from microbiomes containing bacterial vaginosis-associated bacteria. *Microbiology (Reading)*. 2016;162(3):466–75.
DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000238>
33. Демкин В.В. Видовое разнообразие лактобактерий вагинального микробиома: как посмотреть. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2018;36(3):3–12. Demkin V.V. Species diversity of lactobacilli of vaginal microbiome: how to observe it. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2018;36(3):3–12.
DOI: <https://doi.org/10.17116/molgen2018360313>
EDN: <https://elibrary.ru/yqcvfj>
34. Синякова А.А., Шипицына Е.В., Будилковская О.В. и др. Клинико-анамнестические и микробиологические предикторы невынашивания беременности. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2019;68(2):59–70. Sinyakova A.A., Shipitsyna E.V., Budilovskaya O.V., et al. Anamnestic and microbiological predictors of miscarriage. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2019;68(2):59–70.
DOI: <https://doi.org/10.17816/JOWD68259-7>
EDN: <https://elibrary.ru/skxymp>
35. Будилковская О.В., Шипицына Е.В., Герасимова Е.Н. и др. Видовое разнообразие вагинальных лактобацилл в норме и при дисбиотических состояниях. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2017;66(2):24–32. Budilovskaya O.V., Shipitsyna E.V., Gerasimova E.N., et al. Species diversity of vaginal lactobacilli in norm and in dysbiotic states. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2017;66(2):24–32.
DOI: <https://doi.org/10.17816/JOWD66224-32>
EDN: <https://elibrary.ru/ynbwbd>
36. Спиридонова Н.В., Каганова М.А., Девятова О.О., Безрукова А.А. Особенности микробиоты цервикального канала во втором триместре беременности при истмико-цервикальной недостаточности с клиникой вульвовагинита в зависимости от pH влагалищного содержимого. *Доктор.Ру*. 2021;20(6):12–9. Spiridonova N.V., Kaganova M.A., Devyatova O.O., Bezrukova A.A. Cervical canal microbiota features in second trimester of pregnancy in insuficiencia istmicocervical with clinical signs of vulvovaginitis depending on vaginal discharge pH. *Doctor.ru*. 2021;20(6):12–9.
DOI: <https://doi.org/10.31550/1727-2378-2021-20-6-12-19>
EDN: <https://elibrary.ru/ghhfmq>
37. Ворошилина Е.С., Зорников Д.Л., Боронина Л.Г. Результаты определения видового состава лактобацилл при использовании молекулярно-генетических и культуральных методов исследования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;(4):17–21. Voroshilina E.S., Zornikov D.L., Boronina L.G. Results of determining the species composition of vaginal lactobacilli using real-time PCR testing and bacteriological method. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;(4):17–21.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-17-21>
EDN: <https://elibrary.ru/alalip>
38. Dasari S. Recent findings of *Lactobacillus* diversity and their functional role in vaginal ecosystems. In: Buddolla V., ed. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Elsevier;2019:3–12.
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00001-5>

39. Ворошилина Е.С., Зорников Д.Л., Иванов А.В. и др. Микробиота эякулята: кластерный анализ результатов, полученных при исследовании методом ПЦР-ПВ. *Вестник РГМУ*. 2020;(5):66–73. Voroshilina E.S., Zornikov D.L., Ivanov A.V., et al. Semen microbiota: cluster analysis of real-time PCR data. *Bulletin of RSMU*. 2020;(5):66–73. DOI: <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2020.064>
40. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Микрoэкологический подход к оценке особенностей микробиоты эякулята в профилактике снижения фертильности. *Профилактическая медицина*. 2020;23(3):108–12. Godovalov A.P., Karpunina T.I. Microecological approach to assessing the characteristics of the ejaculate microbiota in the prevention of fertility decline. *Preventive Medicine*. 2020;23(3):108–12. DOI: <https://doi.org/10.17116/profmed202023031108> EDN: <https://elibrary.ru/ytaykj>
41. Уварова Е.В., Батырова З.К. Преимущество комплексной коррекции микробиоценоза влагалища в раннем репродуктивном возрасте. *Медицинский совет*. 2019;(13):142–7. Uvarova E.V., Baturova Z.K. Advantage of complex correction of vaginal microbiocenosis at an early reproductive age. *Medical Council*. 2019;(13):142–7. DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-13-142-147> EDN: <https://elibrary.ru/eblibq>
42. Малаева Е.Г. Инфекции мочевыводящих путей и микробиота. *Проблемы здоровья и экологии*. 2021;18(3):5–14. Malaeva E.G. Urinary tract infections and microbiota. *Health and Ecology Issues*. 2021;18(3):5–14. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2021-18-3-1> EDN: <https://elibrary.ru/tqulmj>
43. Valenti P., Rosa L., Sapobianco D., et al. Role of lactobacilli and lactoferrin in the mucosal cervicovaginal defense. *Front. Immunol.* 2018;9:376. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00376>
44. Yang X., Da M., Zhang W., et al. Role of Lactobacillus in cervical cancer. *Cancer Manag. Res.* 2018;10:1219–29. DOI: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S165228>
45. Почерников Д.Г., Постовойтенко Н.Т., Гетьман В.В., Галкина И.С. Диагностическая значимость выявления *Lactobacillus* spp. в эякуляте. *Вестник РГМУ*. 2020;(3):42–8. Pochernikov D.G., Postovoiitenko N.T., Get'man V.V., Galkina I.S. Diagnostic significance of *Lactobacillus* spp. identification in ejaculate. *Bulletin of RSMU*. 2020;(3):42–8. DOI: <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2020.039>
46. Baud D., Pattaroni C., Vulliemoz N., et al. Sperm microbiota and its impact on semen parameters. *Front. Microbiol.* 2019;10:234. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00234>
47. Каганова М.А., Спиридонова Н.В. Микробиота мочевыводящих путей и цервикального канала при доношенной беременности. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2020;19(1):68–76. Kaganova M.A., Spiridonova N.V. Microbiota of the urinary tract and the cervical canal during full-term pregnancy. *Gynecology, Obstetrics and Perinatology*. 2020;19(1):68–76. DOI: <https://doi.org/10.20953/1726-1678-2020-1-68-76> EDN: <https://elibrary.ru/btydiq>
48. Kim J.M., Park Y.J. Lactobacillus and urine microbiome in association with urinary tract infections and bacterial vaginosis. *Urogenit. Tract Infect.* 2018;13(1):7–13. DOI: <https://doi.org/10.14777/uti.2018.13.1.7>
49. Perez-Carrasco V., Soriano-Lerma A., Soriano M., et al. Urinary microbiome: yin and yang of the urinary tract. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021;11: 617002. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.617002>
50. Tsibere O., Miller-Ensminger T., Voukadinova A., et al. Draft genome sequence of *Lactobacillus mulieris* UMB7784, isolated from the female urinary tract. *Microbiol. Resour. Announc.* 2020;9(21):e00403–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/MRA.00403-20>
51. Коган М.И., Набока Ю.Л., Рьзкин А.В., Васильев О.Н. Микробиота/микробиом мочи и рак мочевого пузыря. *Онкоурология*. 2020;16(2):97–103. Kogan M.I., Naboka Yu.L., Ryzhkin A.V., Vasil'ev O.N. Microbiota/microbiome urine and bladder cancer. *Cancer Urology*. 2020;16(2):97–103. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2020-16-2-97-103> EDN: <https://elibrary.ru/fzbzca>
52. Пестрикова Т.Ю., Котельникова А.В. Видовой состав вагинальной лактофлоры у женщин с заболеваниями влагалища и шейки матки. *Женское здоровье и репродукция*. 2021;(2):16–25. Pestrikova T.Yu., Kotel'nikova A.V. Species composition of vaginal lactoflora in women with vaginal and cervical diseases. *Women's Health and Reproduction*. 2021;(2):16–25. EDN: <https://elibrary.ru/wtrpfe>
53. Duale A., Singh P., Al Khodor S. Breast milk: a meal worth having. *Front. Nutr.* 2022;8:800927. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.800927>
54. Sallam M.K., Wali I.E., Attia A.E.F.M.H., Mehanna N. Isolation of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* species from human breast milk. *Egypt. J. Med. Microbiol.* 2015;24(3):69–73. DOI: <https://doi.org/10.12816/0024931>
55. Witkowska-Zimny M., Kaminska-El-Hassan E. Cells of human breast milk. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2017;22:11. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11658-017-0042-4>
56. Кайбышева В.О., Жарова М.Е., Филимендикова К.Ю., Никонов Е.Л. Микробиом человека: возрастные изменения и функции. *Доказательная гастроэнтерология*. 2020;9(2):42–55. Kaibysheva V.O., Zharova M.E., Filimendikova K.Yu., Nikonov E.L. Human microbiome: age-related changes and functions. *Russian Journal of Evidence-Based Gastroenterology*. 2020;9(2):42–55. DOI: <https://doi.org/10.17116/dokgastro2020902142> EDN: <https://elibrary.ru/ykxbqq>
57. Łubiech K., Twarużek M. Lactobacillus bacteria in breast milk. *Nutrients*. 2020;12(12):3783. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12123783>
58. Sarkar A., Yoo J.Y., Valeria Ozorio Dutra S., et al. The association between early-life gut microbiota and long-term health and diseases. *J. Clin. Med.* 2021;10(3):459. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10030459>
59. Albesharat R., Ehrmann M.A., Korakli M., et al. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst. Appl. Microbiol.* 2011;34(2):148–55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.12.001>
60. Soto A.V., Martín V., Jiménez E., et al. *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2014;59(1):78–88. DOI: <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000347>
61. Mu Q., Tavella V.J., Luo X.M. Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Front. Microbiol.* 2018;9:757. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757>
62. Ding M., Qi C., Yang Z., et al. Geographical location specific composition of cultured microbiota and *Lactobacillus* occurrence in human breast milk in China. *Food Funct.* 2019;10(2):554–64. DOI: <https://doi.org/10.1039/c8fo02182a>
63. Datta P., Gupta V., Mohi G.K., et al. *Lactobacillus coryniformis* causing pulmonary infection in a patient with metastatic small cell carcinoma: case report and review of literature on *Lactobacillus* pleuro-pulmonary infections. *J. Clin. Diagn. Res.* 2017;11(2):DE01–5. DOI: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/22837.9391>

Информация об авторах

Ташланова Виктория Владимировна — биолог бактериологической лаборатории Тюменского НИИ краевой инфекционной патологии, Тюмень, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1002-413X>

Катаева Любовь Владимировна[✉] — д.м.н., г.н.с., зав. бактериологической лабораторией Тюменского НИИ краевой инфекционной патологии, Тюмень, Россия, info@tniikip.rospotrebnadzor.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9966-8454>

Степанова Татьяна Федоровна — д.м.н., профессор, директор Тюменского НИИ краевой инфекционной патологии, Тюмень, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6289-6274>.

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 17.06.2023;
принята к публикации 10.08.2023;
опубликована 28.08.2023

Information about the authors

Victoriya V. Tashlanova — biologist, Bacteriological laboratory, Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology, Tyumen, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1002-413X>

Lyubov V. Kataeva[✉] — D. Sci. (Med.), chief researcher, Head, Bacteriological laboratory, Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology, Tyumen, Russia, info@tniikip.rospotrebnadzor.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9966-8454>

Tatyana F. Stepanova — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology, Tyumen, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6289-6274>

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 17.06.2023;
accepted for publication 10.08.2023;
published 28.08.2023

ЮБИЛЕИ

100 лет с именем Пастера



История образования Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, который в 2023 г. отметил 100-летие со дня присвоения ему имени выдающегося французского учёного, берёт своё начало в 1908 г. Тогда в Санкт-Петербурге силами учёных Якова Юльевича Либермана, Петра Петровича Маслаковца и Георгия Дмитриевича Белоновского была создана Первая серодиагностическая и бактериологическая лаборатория, которая в 1910 г. уже имела статус Бактериологического и диагностического института. Во время революции институт был национализирован и преобразован во Вторую городскую лабораторию. 4 апреля 1923 г. приказом Петроградского губернского отдела здравоохранения Вторая городская бактериологическая лаборатория была преобразована в Петроградский бактериологический и диагностический институт. На основании ходатайства Губздравотдела Президиумом Петрогубисполкома 5 мая 1923 г. учреждение переименовано в Петроградский бактериологический институт имени Пастера (в ознаменование 100-летия со дня рождения Пастера).

В 1920-е гг. Парижский Институт Пастера передал в дар ленинградскому Институту имени Пастера бюст Луи Пастера, выполненный скульптором Наумом Аронсоном по заказу французского Правительства к 100-летию юбилею великого учёного.



Бюст Луи Пастера в конференц-зале Института.

Со дня образования Институт приобрёл все черты учреждения пастеровского типа: многопрофильность по изучаемым инфекциям, постоянную связь с практикой, комплексность в методологии, а именно способность самостоятельно решать все научные задачи — от выделения этиологического агента до создания вакцин и сывороточных препаратов. Институт принял активное участие в ликвидации эпидемиологических последствий Первой мировой и Гражданской войн. Было оперативно развернуто производство актуаль-

ных для того времени вакцин, организованы кампании массовой вакцинопрофилактики против различных болезней, внедрена комплексная система их бактериологической и серологической диагностики на собственной базе и в лечебно-профилактических учреждениях города.

На базе Института стала работать первая в истории российской медицины вакцинно-сывороточная комиссия, положившая начало экспертизе, контролю и стандартизации национальных средств специфической диагностики, лечению и профилактике инфекционных заболеваний. Комиссию возглавлял академик Даниил Кириллович Заболотный. В 1929 г. в состав Института влились Институт по изготовлению оспенного детрита (Оспопрививательный институт) им. Дженнера и Малярийная станция.

Уже в конце 1920-х — начале 1930-х гг. Институт заявил о себе оригинальными идеями и разработками. Лидер микробиологического направления работ в Институте Оскар-Генрих Оскарович Гартох одним из первых в мировой науке выдвинул и обосновал идеи о неоднородности возбудителей инфекций в пределах одних и тех же нозологических форм заболевания. В 1930-е годы начинают складываться собственные научные школы под влиянием трудов О.О. Гартоха, С.С. Казарновской, Э.М. Новгородской, Г.И. Беседина. В полной мере сформировалось вирусологическое направление исследований, возглавляемое Анатолием Александровичем Смородинцевым.

Наряду с развитием научных исследований Институт в 1930-е гг. принял непосредственное участие в формировании санитарно-эпидемиологической службы страны. Изначально учреждению принадлежит приоритетная роль и в разработке проблем зооантропонозных инфекций. На его базе несколько лет функционировала противочумная станция, а в 1933 г. был основан отдел паразитарных тифов, развившийся в многопрофильное подразделение по изучению проблем природно-очаговых инфекций. На 1930–1940-е гг. приходится расцвет исследований в области иммунологии.

С начала Великой Отечественной войны, оставаясь единственным научно-практическим учреждением города в области эпидемиологии и микробиологии, Институт становится «противоэпидемическим штабом». В тяжёлые дни войны и 900-дневной блокады Ленинграда Институт ни на

активное участие в ликвидации эпидемиологических последствий Первой мировой и Гражданской войн. Было оперативно развернуто производство актуаль-



Сотрудники Института, 1945 г.

один день не прекращал своей работы. Наряду с противоэпидемической работой в течение всего периода войны и блокады Ленинграда пастеровцы продолжали научные исследования. Их результаты публиковались в специальных сборниках работ ленинградских врачей, переправляемых из осаждённого города по Дороге жизни через Ладожское озеро.

В 1950–1960-е гг. Институт вошёл в число мировых лидеров по проблемам кишечных инфекций: шигеллёзов, сальмонеллёзов, эшерихиозов, детских бактериальных инфекций, полиомиелита и энтеровирусных инфекций, респираторных вирусных инфекций и природноочаговых болезней. Учёными Института выявлены новые расы энтеропатогенных кишечных палочек; независимо от зарубежных учёных открыты новые возбудители шигеллёзов (получившие позже наименование шигеллы Бойда); дана развёрнутая характеристика острых кишечных инфекций у детей раннего возраста. Это позволило разработать и внедрить в практику систему мер специфической диагностики, лечения и профилактики колитов и энтеритов и в 10 раз снизить смертность от них среди детей первого года жизни.

С 1963 г. Институт стал принимать участие в осуществлении программ Всемирной организации здравоохранения в странах Азии, Африки и Латинской Америки (Кения, Уганда, Танзания, Сомали, Нигерия, Конго, Монголия, Индия, Бирма, Иран, Непал, Мозамбик, Куба, Бангладеш, Йемен и др.).

В 1970–1980-е гг. Институт выступал лидером в области вакцинопрофилактики гриппа, инициатором и организатором программы ревакцинации против кори, добившись в итоге включения ревакцинации в национальный календарь прививок.

Выполнены приоритетные научные разработки, приведшие к созданию новой области биотехнологии — тонкой иммунохимии. Институт входил в число лидеров в стране в области разработки проблем этиологии инфекционных болезней. В его стенах впервые в СССР выделены и идентифицированы возбудители «новых» инфекций вирусной и бактериальной природы: геморрагической лихорадки с почечным синдромом, кампилобактериоза и хеликобактер пилори-инфекции.

В 1993 г. Институт принят в Международную сеть Пастеровских институтов; сегодня в Сеть входят 32 института, расположенных на 5 континентах в 25 странах. Институт сотрудничает с Парижским Институтом Пастера и другими институтами Сети по проблемам микробиологии, эпидемиологии, вирусологии и иммунологии (в том числе в рамках программ ликвидации и элиминации инфекционных болезней).

В настоящее время Институт продолжает активное сотрудничество с ВОЗ: заместитель директора по научной работе Владимир Георгиевич Дедков является экспертом-консультантом ВОЗ, членом Научной консультативной группы по происхождению новых патогенов (SAGO). На базе Института действуют две субнациональные лаборатории, аккредитованные в ВОЗ (по диагностике полиомиелита и по диагностике кори и краснухи). С 2004 г. лаборатория кишечных инфекций Института проводит обучающие курсы ВОЗ по глобальному надзору за заболеваниями, передающимися с пищевыми продуктами (WHO GFN).

Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера поддерживает и раз-

вивает научные контакты и совместные проекты со странами Европы (Франция, Бельгия, Италия, Сербия), Азии (Китай, Вьетнам, Лаос), Южной Америки (Венесуэла) и Африки (Гвинейская Республика, Сенегал, Республики Конго, Центральноафриканская Республика), а также с дружественными странами Закавказья и Центральной Азии.

На базе Института действует одно из активнейших отделений Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов — отделение по Санкт-Петербургу и Ленинградской области.

Институт с 2011 г. издает научный журнал «Инфекция и иммунитет», входящий в список реферируемых журналов ВАК; журнал включён в мультидисциплинарную библиографическую и реферативную базу данных Scopus и Web of Science и в настоящее время является одним из ведущих российских научных журналов по проблеме инфекционной иммунологии.

В Институте действует аспирантура по специальностям: микробиология, вирусология, иммунология, эпидемиология, инфекционные болезни.

В настоящее время Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера проводит фундаментальные и прикладные исследования в области эпидемиологии, микробиологии и биотехнологии в целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения России. В структуру Института входят 5 отделов и 20 научных лабораторий, на базе которых действуют две субнациональные лаборатории ВОЗ по диагностике полиомиелита и по диагностике кори/краснухи; референс-центры по мониторингу за брюшным тифом и по мониторингу за иерсиниозами; Научно-методический центр по эпидемиологическому надзору за вирусными гепатитами; региональные центры по эпидемиологическому надзору за полиомиелитом, корью/краснухой, по сальмонеллезам, по риккетсиозам, Северо-Западный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИДом. Институт в целом выполняет функции научно-методического центра по мониторингу за возбудителями инфекционных заболеваний в Северо-Западном федеральном округе.

Помимо этого в состав Института входят Испытательный лабораторный центр, Медицинский центр, издательство и опытно-промышленное производство, выпускающее широкий спектр диагностических препаратов и селективных питательных сред для культивирования микроорганизмов (более 200 наименований).

Наличие собственного медицинского центра позволяет Институту в кратчайшие сроки внедрять пациентоориентированные научные разработки в практическое здравоохранение, проводить экспертные диагностические исследования в области бак-

териологии, вирусологии, вакцинопрофилактики, клинической иммунологии.

С 2022 г. Институт участвует в реализации федерального проекта «Санитарный щит — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)», осуществляя экстерриториальный мониторинг инфекционных угроз, генетический мониторинг изменчивости возбудителей, разработку экспресс-тестов для диагностики за 60 мин, создавая электронный каталог микроорганизмов и биотоксинов.

С 2019 г. Институт стабильно входит в число ведущих научных учреждений страны. В Институте работают 2 академика РАН, 1 член-корреспондент РАН, 10 профессоров, 25 докторов наук, 59 кандидатов наук. В Институте активно ведутся инновационные разработки. Только за последние 5 лет получено 102 патента и 21 регистрационное удостоверение на средства диагностики.

С начала пандемии новой коронавирусной инфекции приоритетным направлением в деятельности Института стала работа по изучению и противодействию SARS-CoV-2 и профилактике других инфекционных заболеваний. В кратчайшие сроки была создана ковидная лаборатория, работающая в разгар пандемии в круглосуточном режиме. Были разработаны ПЦР-набор для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 и ИФА-набор для количественного определения антител человека класса IgG к N-белку SARS-CoV-2, и в связи с последующим получением госзаказа на их выпуск были восстановлены производственные мощности для крупносерийного производства диагностических тест-систем.

За разработку Программы по оценке популяционного иммунитета населения страны к новой коронавирусной инфекции и за её реализацию в 2020–2022 гг. в 26 регионах Российской Федерации группа учёных Института удостоена главной премии страны в области медицины «Призвание». По заданию Правительства РФ с 2021 г. эта программа успешно реализована в дружественных зарубежных странах: Беларуси, Киргизии, Таджикистане, Армении. По существу, Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера является головным научно-исследовательским учреждением в Северо-Западном федеральном округе по проблемам эпидемиологии, микробиологии и иммунологии. Тесное и постоянное взаимодействие осуществляется Институтом с санитарно-эпидемическими службами, органами здравоохранения, службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Всё это создаёт прочную основу для дальнейшего планомерного развития и совершенствования деятельности ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

К 70-летию члена-корреспондента РАН Михаила Ивановича Михайлова



10 августа 2023 года исполнилось 70 лет со дня рождения выдающегося отечественного эпидемиолога и вирусолога, ведущего специалиста в области изучения гепатитов и других вирусных инфекций, члена-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора Михаила Ивановича Михайлова.

М.И. Михайлов после окончания 1-го Московского медицинского института им. И.М. Сеченова (1976 г.) работал в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР под руководством академика АМН СССР В.М. Жданова и профессора В.А. Ананьева старшим лаборантом, младшим, затем старшим научным сотрудником. Успешно защитил кандидатскую (1981 г.) и докторскую (1988 г.) диссертации по проблемам вирусных гепатитов. С 1990 по 2005 г. работал в НИИ микробиологии и эпидемиологии им. Н.Ф. Гамалеи руководителем лаборатории индикации. В 1996 г. ему было присвоено звание профессора по специальности «Эпидемиология». В 2011 г. М.И. Михайлов избран членом-корреспондентом РАН (с 2013 г. — член-корреспондент РАН по Отделению медицинских наук).

В 2006–2016 гг. М.И. Михайлов возглавлял Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов

им. М.П. Чумакова, а также с 2009 по 2016 г. — кафедре микробиологии и вирусологии Российского университета дружбы народов. В 2016–2022 гг. М.И. Михайлов являлся научным руководителем НИИ молекулярной и персонализированной медицины Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования. С 2016 г. по настоящее время М.И. Михайлов работает руководителем лаборатории вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, а также с 2023 г. — главным научным сотрудником Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.

М.И. Михайлов — крупный учёный и авторитетный в России и за рубежом специалист в области эпидемиологии, вакцинопрофилактики и диагностики гепатитов и других вирусных инфекций, выдающийся организатор науки. Под его руководством разработаны и внедрены научно обоснованные системы эпиднадзора и противоэпидемических мероприятий по борьбе с вирусными гепатитами и полиомиелитом. Михаилом Ивановичем получены новые данные, имеющие приоритетное значение в таких областях, как закономерности распространения вирусных гепатитов различной этиологии (гепатиты А, В, С, D и E) в разных регионах России и бывших республик СССР, механизмы циркуляции гепаднавирусов и вируса гепатита E среди различных видов животных. Также при его участии разработаны и внедрены в практику отечественного здравоохранения региональные программы по борьбе с вирусными гепатитами, включая программы по вакцинопрофилактике гепатитов А и В. Важным направлением научной деятельности М.И. Михайлова является разработка и внедрение экспериментальных моделей инфекций, вызываемых гепатотропными вирусами. При активном участии Михаила Ивановича разработаны и внедрены в практику здравоохранения современные диагностические и профилактические препараты, создана Федеральная система оценки качества лабораторной диагностики вирусных гепатитов.

В настоящее время фундаментальные и прикладные исследования, осуществляемые под руководством М.И. Михайлова, направлены на достижение элиминации вирусных гепатитов как проблемы общественного здравоохранения и посвящены важнейшим приоритетным направлениям изуче-

ния экологии вирусов, принципов взаимодействия вирусов и макроорганизма, а также молекулярной эпидемиологии, диагностики и профилактики вирусных гепатитов.

Михаил Иванович получил заслуженную известность как талантливый организатор науки, опытный педагог и воспитатель научных кадров. Он является создателем научной школы учёных, успешно работающих во многих регионах России и мира: Белоруссии, Азербайджане, Молдове, Египте, Ираке, Кот-д'Ивуаре, Йемене. Под его руководством выполнены и защищены 8 докторских и 37 кандидатских диссертаций. Число опубликованных им научных публикаций превышает 440, из них 218 опубликованы в журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Заслуги М.И. Михайлова отмечены ведомственными и международными наградами: благодарностью ВОЗ, медалью «М.С. Балаян — за вклад в исследования гепатита Е», почётной грамотой Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, памятными медалями «90 лет Госсанэпидслужбе России» и «95 лет Госсанэпидслужбе России», званием «Заслуженный работник здравоохранения Республики Тыва».

Михаил Иванович ведёт большую научно-организационную работу. Он является членом президиума Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, членом бюро Учёного совета Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заместителем председателя проблемной комиссии «Вирусные гепатиты», членом диссертационного совета ДСУ 208.001.18 при Сеченовском Университете.

М.И. Михайлов — основной вдохновитель и организатор серии российских научно-практических конференций по вирусным гепатитам, проводящихся уже более 25 лет, а также регулярно выступает с докладами на международных научных мероприятиях, состоит действительным членом нескольких иностранных академий.

Сотрудники Отделения медицинских наук РАН, ЦНИИ эпидемиологии, НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ученики и соратники в деле борьбы с вирусными гепатитами поздравляют юбиляра и желают ему дальнейших успехов в научной и педагогической деятельности, крепкого здоровья, душевной стойкости, оптимизма, многих лет жизни для успешной реализации всех творческих замыслов и новых свершений на благо науки!